ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 N° 103

L'AUTOMATISATION DU SERO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT DANS LA PROPHYLAXIE DE LA BRUCELLOSE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

(BURGUIERE Paul, Antoine, Emile)

Né le 20 juin 1943 à Loches (Indre-et-Loire)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD, Prof. à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs : M. BERTHELON, Prof. à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse.
M. SAURAT, Prof. à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse.

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE (Vve LION)
16, rue Lakanal, 16

1972

L'AUTOMATISATION DU SERO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT DANS LA PROPHYLAXIE DE LA BRUCELLOSE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536510_0048

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1972 N° 103

L'AUTOMATISATION DU SERO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT DANS LA PROPHYLAXIE DE LA BRUCELLOSE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

(BURGUIERE Paul, Antoine, Emile)

Né le 20 juin 1943 à Loches (Indre-et-Loire)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD, Prof. à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs : M. BERTHELON, Prof. à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse.
M. SAURAT, Prof. à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse.

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE (Vve LION)
16, rue Lakanal, 16

1972

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur . . . . . MM. FLORIO.
Directeurs honoraires . . . . . PONS.
DARRASPEN.
Professeur honoraire . . . . . LOMBARD.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie-Toxicologie.
— Professeur titulaire . . . . . GODFRAIN.
— Maître-Assistant . . . . . Mme BURGAT-SACAZE.
Pharmacie - Toxicologie.

Chaire de Physique-Chimie biologiques et médicales.
— Professeur titulaire . . . . . MM. RICO.
Physique biologique et médicale. Chimie biologique et médicale.

Chaire d'Anatomie des Animaux domestiques.
— Professeur titulaire . . . . . PAVAUX.
Anatomie descriptive. Extérieur. Anatomie appliquée. Tératologie.

Chaire de Physiologie - Thérapeutique.
— Professeur titulaire. . . . . RUCKEBUSCH.
— Maître de Conférences non Chef de Service. . . . . FARGEAS.
Physiologie - Thérapeutique - Pharmacodynamie.

Chaire d'Histologie - Anatomie pathologique.
— Professeur titulaire. . . . . VAN HAVERBEKE.
— Professeur sans chaire. . . . . CABANIÉ.
— Maître-Assistant . . . . . MAGNOL.
Histologie - Embryologie - Anatomie pathologique.

Chaire d'Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale.
— Professeur titulaire . . . . . LABIE.
— Maître-Assistant . . . . . EECKHOUTTE.
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale.

Chaire de Parasitologie et Maladies parasitaires.
— Professeur titulaire . . . . . BRIZARD.
— Maître-Assistant Agrégé . . . . . DORCHIES.
Zoologie appliquée. Parasitol. externe. Parasitol. interne. Clinique.

Chaire de Sémiologie et Pathologie médicale des équidés et carnivores.
— Professeur titulaire . . . . . FLORIO.
— Professeur sans chaire. . . . . LESCURE.
— Maître-Assistant . . . . . GUELFI.
Sémiologie et Pathologie médicale des équidés et des carnivores. Législation vétérinaire et Déontologie. Clinique.

Chaire de Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour.
— Professeur titulaire . . . . . TOURNUT.
— Professeur sans chaire. . . . . ESPINASSE.
— Maître-Assistant . . . . . BÉZILLE.
Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour. Clinique. Clinique ambulatoire.

Chaire de Pathologie chirurgicale.
— Professeur titulaire . . . . . CAZIEUX.
Propédeutique et Sémiologie chir. Technique chir. Pathologie chir.

Chaire de Pathologie de la Reproduction.
— Professeur titulaire . . . . . BERTHELON.
— Professeur sans chaire. . . . . ROYAL.
— Maître-Assistant . . . . . TAINTURIER.
Sémiologie et Propédeutique. Pathologie de la reproduction. Obstétrique. Clinique.

Chaire de Maladies contagieuses. Zoonoses. Législation sanitaire.
— Professeur titulaire . . . . . SAURAT.
— Maître-Assistant Agrégé . . . . . CHANTAL.
Maladies contagieuses. Zoonoses. Législation sanitaire.

Chaire de Pathologie générale. Microbiologie. Immunologie.
— Professeur titulaire . . . . . LAUTIÉ.
— Maître-Assistant . . . . . MEIGNIER.
Microbiologie. Immunologie. Pathologie générale.

Chaire de Zootechnie et d'Economie rurale.
— Professeur titulaire . . . . . QUEINNEC.
— Maître-Assistant . . . . . DARRÉ.
Ethnologie. Génétique appliquée. Hygiène générale. Zootechnie. Elevage. Economie générale et des productions animales.

Chaire d'Alimentation.
— Professeur titulaire . . . . . FALIU.
— Maître de Conférences non Chef de Service. . . . . GRIESS.
Botanique appliquée et Bromatologie. Agronomie. Alimentation.

COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses . . . . . MM. MONNIER.
Aspect médical des Zoonoses . . . . . ARMENGAUD.
Energétique . . . . . LABOUCHE.
Initiation à l'informatique biomédicale. . . . . FERNET.
Agronomie . . . . . COMBRET.
Métabolismes . . . . . RAYNAUD.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats.
(Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924.)

UNIV. LEIDEN BIBL.

A MA FEMME

Pour tout...

A MES PARENTS

En témoignage de ma grande reconnaissance et de ma profonde affection.

A MES FRÈRE ET SŒURS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur ARMENGAUD

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

Monsieur le Professeur BERTHELON

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'honneur

Qui a bien voulu accepter d'être le rapporteur de ce travail.
Avec toute notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur SAURAT

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'honneur

Qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.
Qu'il trouve ici le témoignage de toute notre gratitude.

A TOUS NOS PROFESSEURS

DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE

DE TOULOUSE

PLAN

•

Avant-Propos. Introduction.

LES METHODES DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE

1. Mise en évidence des agglutinines.

11. Dans le lait :

111. Test de l'anneau ou Ring-Test.

112. Lactoséro-agglutination.

12. Dans le sérum :

121. Séro-agglutination lente en tube.

122. Réaction à l'antiglobuline ou méthode de Coombs.

123. Test au Rose de Bengale.

124. Muco-agglutination.

125. Spermo-agglutination.

2. Mise en évidence des sensibilisatrices du sérum : fixation du complément.

3. Autres méthodes sérologiques.

31. Immunofluorescence.

32. Diffusion.

33. Electrophorèse.

34. La conglutination.

35. Hémagglutination passive.

4. Résumé des principaux diagnostics sérologiques.

DU CHOIX DE LA METHODE D'AUTOMATISATION

1. Les principales méthodes.

11. Le flux continu.

12. Les microméthodes automatiques.

13. La dilution préclassée contrôlable.

2. Les différents schémas prophylactiques.
21. Schéma basé sur le Ring-Test.
22. Schéma basé sur le test au Rose de Bengale.
23. Schéma basé sur la prise de sang.

AUTOMATISATION DU SERO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT

1. Conditions préliminaires.
11. Ce qu'il faut.
12. Ce qu'il faut faire.
13. Ce qu'il faut dire.

2. Principe d'analyse.

3. L'appareillage utilisé.
31. Vue d'ensemble du matériel.
32. Paniers, bandes porte-tubes.
33. Ensemble commun aux deux machines M_1 M_2.
34. Machine M_1 distributrice.
341. Sa fonction.
342. Descriptif.
343. Conclusion.
35. Machine M_2 lectrice.
351. Sa fonction.
352. Vue d'ensemble de la M_2.
353. Le problème de la lecture.
354. Le néphélémètre utilisé.
355. Exploitation des résultats de la lecture et impression.

4. Utilisation et avantages de la machine.
41. Utilisation du groupe M_1 - M_2.
42. Avantages du procédé.

Conclusion.

Bibliographie.

AVANT-PROPOS

Qu'il nous soit permis de remercier tout particulièrement M. le Docteur Vaills, Vétérinaire-Inspecteur de la Direction des Services vétérinaires des Pyrénées-Orientales, inventeur de l'appareil, qui a bien voulu nous recevoir dans son laboratoire et nous aider dans l'élaboration de ce travail.

Nos remerciements vont aussi à M. Dhomps qui nous a suggéré le thème de cette thèse.

Que le Vétérinaire-Inspecteur de la Direction des Services vétérinaires de la Gironde trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance; son dévouement et ses conseils ont permis la réalisation de ce travail.

Toute notre gratitude va également à MM. Nathan et Tollet, de la Société Satas, qui nous ont reçu dans leur établissement et qui nous ont fait bénéficier de leur documentation.

INTRODUCTION

La Brucellose est une maladie bien connue en Europe et en particulier en France où elle a le triste privilège d'être maintenant au premier rang des maladies de l'élevage. Depuis quelques années, la Brucellose a fait l'objet, dans notre pays, de nombreux rapports et colloques. Les Journées vétérinaires d'Alfort, en juin 1964, et de Toulouse, en 1965, lui ont accordé une place de tout premier rang.

C'est une maladie infectieuse, contagieuse, inoculable, commune à l'Homme et à de nombreuses espèces animales. Elle est due à l'action spécifique de parvobactéries appartenant au genre « Brucella ». Elle constitue la maladie la plus redoutables de l'élevage, sous la forme d'un processus chronique post-pubertaire, le plus souvent inapparent, mais semé d'un ou plusieurs épisodes aigus : l'avortement, la morti- ou morbinatalité. En outre, la Brucellose constitue une zoonose majeure, surtout professionnelle des vétérinaires, des éleveurs et des bouchers, dont l'origine quasi exclusive est représentée par le réservoir animal.

La maladie revêt donc une double importance économique et hygiénique à laquelle se joint une importance politique et réglementaire concernant le commerce avec les pays étrangers, en particulier ceux membres de la C.E.E.

Aussi, parmi les problèmes que l'Agriculture française doit résoudre, l'éradication de la Brucellose est, sans conteste, celui qui exige une solution urgente, en raison de son incidence déterminante sur le prix de revient, la qualité et les débouchés de nos productions animales.

Produire au moindre coût et répondre aux exigences sanitaires des consommateurs français et étrangers nécessite, pour reprendre les propres termes du Conseil économique et sociale, « la mise en œuvre d'une prophylaxie généralisée, économique et efficace ».

Récemment, au titre de la R.C.B., méthode qui nous vient d'Amérique et qui signifie « Rationalisation des Choix Budgétaires », la Direction de la Prévision au Ministère des Finances a mis à l'étude trois sujets :

— la construction des autoroutes;

— l'aménagement des centres-villes;

— la Brucellose.

On ne peut trouver meilleure preuve de l'importance économique que revêt, en France, cette maladie que nous sommes en train de combattre.

Si la Brucellose fait l'objet d'un plan national d'assainissement, c'est que son coût pour l'économie agricole est devenu intolérable. Ce coût, selon les experts, se situerait entre 400 et 600 millions de francs par an. L'imprécision des chiffres tient, en fait, à l'ignorance où nous sommes du nombre exact d'avortements, dont la déclaration, pourtant obligatoire, est freinée par l'expectative traditionnelle du monde paysan.

A ces coûts s'ajoutent ceux, indéchiffrables, consécutifs aux formes cliniques non abortives, telles les arthrites et les mammites, mais surtout ceux résultant de l'interdiction d'accès aux marchés étrangers pour nos animaux vivants et leurs produits. Leur importance est

telle qu'ils conditionnent en fait le devenir de nos productions nationales.

Tous ces impératifs ont imposé le cadre et les limites du plan de lutte élaboré de 1962 à 1965 par une Commission composée de personnalités représentatives de l'élevage, du commerce du bétail, de la recherche, des laboratoires et de l'administration.

Les textes sont constitués par les décrets du 24 et du 31 décembre 1965, les arrêtés techniques du 3 juin 1966, modifiés, et financier du 13 janvier 1967, modifié.

La prophylaxie de la Brucellose est fondée sur :

— le dépistage des malades;

— l'assainissement des cheptels par l'élimination des infectés, immédiate ou différée, selon les risques plus ou moins grands de contagion qu'ils représentent;

— la protection :

- des animaux exposés à la contagion intérieure dans les effectifs infectés,
- des effectifs indemnes ou assainis exposés aux contaminations extérieures.

Il convient de rappeler qu'il existe beaucoup plus d'infectés inapparents que de malades cliniquement décelables. Dans l'espèce bovine, pour 10 à 12 pour cent d'infectés latents, on note 0,8 pour cent de malades cliniques parmi les femelles. Dans les espèces ovine et caprine, les taux, dans la zone méditerranéenne infectée, sont respectivement de 10 et 2 pour cent.

La forme clinique est essentiellement caractérisée par l'avortement; le vétérinaire qui le constate, soit sur réquisition du maire ou du préfet, effectue un prélèvement de cotylédons placentaires ou, à défaut, de sécrétions utérines ou du contenu gastrique fœtal, ainsi qu'un prélèvement du sang de la mère, qu'il expédie avec ses commémoratifs à un laboratoire agréé.

Le diagnostic de la Brucellose est confirmé par la mise en évidence du germe, le plus souvent par examen microscopique d'un frottis de cotylédons, coloré selon la méthode de STAMP ou de KÖSTER, ou, en cas de besoin, par une mise en culture sur milieu sélectif, par inoculation au cobaye dans quelques cas particuliers.

L'analyse du sang apporte un renseignement précieux et impose, en cas de positivité, de pratiquer sur de nouveaux prélèvements un examen bactériologique qui n'aurait pas été concluant sur les premiers, et trois cas se présentent :

Cas	Sérum	Placenta	Conclusion
I	Positif	Positif	Positif
II	Négatif ou douteux	Positif	Positif : une prise de sang, quinze à vingt jours après la première, révèle la montée des anticorps.
III	Positif ou douteux	Négatif	Mise en culture : culture positive, résultat positif; culture négative, résultat négatif.

La forme latente, quant à elle, se cache sous les apparences de la santé et n'attend qu'une occasion favorable, parfois une simple gestation, pour devenir clinique. La recherche, dans ce cas, est indirecte : la forme latente ne peut être décelée que par l'analyse du sang ou du lait. Celle-ci consiste à mettre en évidence les stigmates humoraux de l'infection.

En matière de brucellose, le diagnostic clinique n'est pas éloquent; dans la plupart des cas, rien ne ressemble plus à un animal malade qu'un animal sain. Le diagnostic sérologique revêt donc une importance toute particulière.

LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE

Tout animal soumis au contact d'un antigène, en l'occurence une brucella, réagit en élaborant des anticorps spécifiques souvent décelables dans le sérum de son sang ou de son lait. C'est en partant de ces données qu'il a été possible de mettre au point des méthodes de diagnostic sérologique de la brucellose, par recherche des anticorps. Divers types d'anticorps spécifiques sont recherchés par le diagnostic :

— Les agglutinines, qui ont la propriété de provoquer directement, *in vitro*, l'agglutination des antigènes spécifiques. Les agglutinats sont alors visibles dans les tubes ou sur lames. Les agglutinines peuvent être recherchées dans le sérum sanguin, dans le lait, le mucus ou le sperme;

— Les sensibilisatrices, substances mises en évidence par la fixation du complément.

1. Mise en évidence des agglutinines

1.1. Dans le lait

1.1.1. *Test de l'anneau ou Ring-Test*

Cette technique s'emploie presque uniquement sur des laits de mélange. Si l'on doit l'employer pour un

lait individuel, il convient alors de diluer auparavant celui-ci au quart avec un lait précédemment reconnu négatif.

L'addition au lait contenant des anticorps spécifiques d'une suspension dense, lavée et colorée de brucella, est suivie de l'agglutination en amas des bactéries qui sont entraînées par les globules butyreux. Il en résulte donc que le lait se décolore progressivement, tandis que se constitue en surface un anneau de crème colorée.

Si le lait ne renferme pas d'anticorps, il reste coloré et l'anneau de crème qui se forme reste incolore. Le meilleur colorant est l'hématoxiline.

Les résultats sont les suivants :

— Crème nettement colorée, lait décoloré : réaction positive.

— Crème et lait de même couleur : réaction suspecte.

— Crème non colorée, lait coloré : réaction négative.

Cette méthode, très sensible et économique, est précieuse pour le dépistage des étables infectées car il suffit de la présence d'une seule femelle brucellique pour rendre sensible à l'épreuve le lait de mélange de huit à dix vaches.

Cette épreuve connaît aussi des limites. Elle n'est utilisable que sur les femelles laitières; elle ne permet pas le diagnostic systématique individuel et elle accuse des erreurs par excès qui atteignent, selon certains auteurs, 25 pour cent, erreurs résultant le plus souvent soit de la qualité de l'antigène employé, soit d'une interprétation trop sévère des résultats. Elle est pourtant appelée à rendre les plus grands services pour les dépistages périodiques de groupe. En fait, la technique est

parfaite en l'absence de vaccinations avec des vaccins vivants. Les Scandinaves qui, en matière de brucellose, ont de l'expérience et des résultats, recommandent cette technique à cause de sa simplicité et de son prix de revient.

1.1.2. *Lacto-séro-agglutination*

Elle s'emploie pour des laits individuels. Elle ne doit pas être utilisée en début et en fin de lactation.

Centrifuger le lait et éliminer la crème. Ajouter deux gouttes de présure testée à 3 ou 4 millilitres de lait écrémé. Porter à 37 °C pendant une demi-heure au moins.

Centrifuger à 3 000 tours/minute pendant cinq minutes. Effectuer l'épreuve d'agglutination avec le lactosérum surnageant, comme s'il s'agissait d'un sérum sanguin. Cette méthode est peu employée. Son seul avantage est d'éviter, sur les femelles laitières, la prise de sang.

1.2. Dans le sérum

1.2.1. *Séro-agglutination lente en tube*

Les prélèvements sont conservés à + 4 °C. Ils seront utilisés le plus rapidement possible après leur réception au laboratoire car l'expérience prouve que le taux d'agglutination de certains sérums peut subir une baisse non négligeable, en quelques jours, surtout à cause de la putréfaction. La lecture s'effectue après une nuit d'étuve à 37 °C, en se basant sur la turbidité du liquide surnageant. Il y a deux manières de s'exprimer :

— le pourcentage d'agglutination;

— le pourcentage d'antigène restant en suspension, étant convenu que l'antigène utilisé est à 100 pour cent:

donc, dans chaque tube, l'antigène est à 50 pour cent (moitié sérum + moitié antigène à 100 pour cent). Lorsque l'agglutination est à 100 pour cent, l'antigène en suspension est à 0 pour cent; lorsque l'agglutination est à 0 pour cent, l'antigène en suspension est à 50 pour cent (et non à 100 pour cent), d'où le tableau suivant :

Pourcentage d'agglutination ou de clarification	Pourcentage d'antigène restant en suspension	Nombre de croix servant à noter le phénomène
100	0	++++ = 4
75	12,5	+++ = 3
50	25	++ = 2
25	37,5	+ = 1
0	50	0

++++ ou 4 = agglutination complète, clarification complète.

+++ ou 3 = agglutination à peu près complète, 75 pour cent de clarification du surnageant.

++ ou 2 = agglutination marquée et clarification égale à 50 pour cent.

+ ou 1 = agglutination très légère et clarification à 25 pour cent.

0 = absence totale de toute agglutination et de toute clarification.

Pour faciliter les lectures et par accord international, il a été décidé que le point 50 pour cent serait retenu comme indiquant la positivité du tube considéré : on lira donc les agglutinations en comparant l'opacité du surnageant à celle d'un tube témoin antigène correspondant à ++. L'opacité + ne sera pas prise en considération (25 pour cent d'agglutination ou 37,5 pour cent d'antigène restant en suspension). La dilution du sérum la plus élevée montrant 50 pour cent d'agglutination (c'est-à-dire 50 pour cent de clarification) est le titre final d'agglutination du sérum étudié.

Phénomène de zone.

Un des gros inconvénients de la S.A.W. est le phénomène de zone. Il est plus fréquent dans le domaine de la brucellose que dans les autres réactions, faisant appel à l'agglutination de particules figurées. Ce phénomène de zone se traduit par l'absence d'agglutination dans certains tubes de la réaction, tandis que cette agglutination se manifeste à des dilutions plus grandes du sérum éprouvé.

On peut constater deux aspects :

— Phénomène de zone initial : absence d'agglutination dans les premiers tubes aux fortes concentrations de sérum et agglutination subséquente selon le schéma : 0, 0, +++, +−+, ++++, 0, 0, 0.

— Phénomène de zone intermédiaire : agglutination dans les premiers tubes, pas d'agglutination dans un ou plusieurs tubes intermédiaires, reprise de l'agglutination comme dans l'exemple suivant :

++++, +++, 0, 0, ++++, +++, 0.

Ce phénomène a donné lieu à de nombreuses publications, en particulier les travaux de Renoux.

Les moyens de lutter contre ce phénomène sont :

— La poursuite de plusieurs dilutions (au moins quatre ou cinq) ;

— L'emploi d'un sérum physiologique hypersalé (50 pour mille) ;

— La réaction de Coombs ;

— Le non-chauffage préalable des sérums, c'est-à-dire l'emploi, pour la S.A.W., de sérum frais ;

— Le traitement éventuel des sérums chauffés par la trypsine (cf. Pilet et coll.).

La séro-agglutination est réalisée dans un laboratoire agréé, à partir des échantillons de sang prélevé sur les animaux.

Les résultats sont quantitatifs et exprimés en Unités Internationales par rapport à un sérum étalon de référence. Conformément à une décision de la C.E.E., le bovin, pour être déclaré indemne, doit présenter un titre inférieur à 30 U.I. agglutinantes par millilitre de sérum, avec toutefois une tolérance pour les animaux âgés de moins de trente mois, vaccinés antérieurement au B 19, qui peuvent être reconnus indemnes avec un taux brucellique inférieur à 80 U.I. et une fixation du complément négative. Ce taux de positivité de 30 U.I. pour les adultes est manifestement sévère. En attendant que les autorités sanitaires étrangères soient amenées à en convenir, a été créée au plan national la catégorie de « présumés indemnes » pour les cheptels bovins dont les animaux jeunes et adultes, vaccinés ou non, présentent un taux d'agglutination inférieur à 80 U.I. et une fixation du complément négative.

De même, pour les petits ruminants, le seuil de négativité inférieur à 25 U.I. a été relevé à un titre inférieur à 80 U.I. si la fixation du complément est négative.

Il convient toutefois de préciser que ces taux ne sont admissibles que dans le cadre du troupeau. Ils ne sauraient être acceptés pour les individus isolés, d'origine inconnue, dont le contrôle sérologique rigoureux doit s'en tenir, pour être reconnu négatif, aux titres inférieurs à 30 U.I. pour les bovins et à 25 U.I. pour les ovins et les caprins, et comprendre en outre une épreuve de fixation du complément dont les résultats doivent être négatifs.

Comme la plupart des méthodes biologiques, l'épreuve de séro-agglutination connaît des limites et accuse des erreurs par défaut pour l'espèce bovine et davantage pour l'espèce ovine et caprine. Cette insuffisance est nulle quand l'épreuve apparaît négative sur la totalité des animaux d'un troupeau. Ces erreurs ne peuvent, en aucun cas, discréditer le séro-agglutination lente.

1.2.2. *Réaction à l'antiglobuline, ou méthode de Coombs*

A côté des anticorps dits complets, capables de fixer le complément et d'agglutiner en amas les bactéries constituant l'antigène spécifique, il peut exister dans le sérum de certains sujets des anticorps dits incomplets capables eux aussi de se fixer sur les corps microbiens, mais incapables de les rassembler en amas et, par conséquent, non décelables par la technique de séro-agglutination classique. On doit à Coombs, Mourant et Race, qui ont étudié des phénomènes semblables dans les processus d'immunologie sanguine, un procédé indirect de mise en évidence des anticorps.

Pour que le complexe antigène-anticorps puisse se former, il faut ajouter à la réaction un chaînon qui est, en l'occurence, l'antiglobuline préparé contre la même espèce animale que le sérum suspect à éprouver, soit un sérum antisérum plus simple à préparer. L'antigène adopté dans cette méthode est le même que celui que l'on utilise pour la séro-agglutination lente en tube, sous réserve qu'il ne contienne pas d'antigène soluble.

Après deux heures d'incubation du sérum à 37 °C, en présence d'antigène, le complexe Ag-Ac formé est séparé des parties solubles par trois centrifugations et lavages successifs, puis remis en suspension en eau salée à 8,5 pour cent. On ajoute alors une goutte de sérum

antiglobuline de l'espèce correspondante, dilué, et l'on porte à 37 °C durant une nuit.

Si le sérum contient des anticorps, ils se seront fixés sur les corps microbiens de l'antigène qui, ainsi marqués par la globuline anticorps, agglutineront de manière visible comme s'il s'agissait d'une séro-agglutination ordinaire.

Interprétation des résultats.

La réaction à l'antiglobuline se lit comme une réaction d'agglutination ordinaire. Les sérums qui donnent avec cette méthode une agglutination au moins ++ sont considérés comme positifs et provenant d'animaux brucelliques.

L'utilité essentielle de la réaction à l'antiglobuline est la mise en évidence d'anticorps spécifiques anti-brucelliques dans les sérums négatifs à la réaction d'agglutination classique, ou qui seraient anticomplémentaires ou, plus rarement, également négatifs à la fixation du complément.

Elle présente en outre le gros avantage de faire la discrimination entre les anticorps spécifiques et les anticorps non spécifiques présents à faible titre. La réaction à l'antiglobuline est négative avec certains sérums positifs, aux titres du 1/10 ou 1/20 à la réaction d'agglutination. Aussi, malgré l'inconvénient qui consiste à préparer les divers sérums antiglobuline éventuellement nécessaires, cette réaction à l'antiglobuline est justifiée pour le diagnostic de la brucellose par sa spécificité, chaque fois que l'on se trouvera en présence d'un sérum animal que tous les commémoratifs rendent suspect et qui serait négatif aux réactions classiques.

1.2.3. *Test au Rose de Bengale*

Principe.

C'est une séro-agglutination rapide sur lame ou sur carte, utilisant une suspension colorée de brucella en milieu tamponné acide. On parle de test au Rose de Bengale, d'après le nom du colorant utilisé, ou « card test », test de la carte, puisque la réaction s'effectue sur une petite carte, ou encore d'épreuve à l'antigène tamponné.

Préparation du réactif.

— Souche *Brucella abortus* 11.19-3.

— Tampon { NaOH pur = 12 g, Acide lactique à 85 pour cent = 54 ml, Sérum physiologique phénolé *q. s.* = 0,9 litre.

— Colorant à 1 p. cent { Rose de Bengale = 1 g, Eau distillée = 99 ml.

— Suspension mère colorée.

Germes : quantité suffisante pour avoir 35 grammes de brucella dans 787,5 ml de sérum physiologique phénolé, et ajouter 22,5 ml de Rose de Bengale à 1 pour cent.

Agiter stérilement et magnétiquement deux heures. Filtrer sur coton et centrifuger à 4 000 tours/minute. Peser exactement le précipité et le diluer à raison de :

{ Brucella coloré = 1 g,
{ Tampon = 2 ml.

Agiter magnétiquement et stérilement trois heures.

— Épreuve (standardisation) :

{ Suspension mère colorée = 3 ml,
{ Tampon = 11 ml.

Agiter magnétiquement et stérilement deux heures.

Filtrer sur coton, agiter de nouveau deux heures.

Évaluer, après centrifugation (à 2 750 tours/minute R = 30 cm), le volume cellulaire qui doit être de 8 pour cent. Sinon, ajuster à 8 pour cent avec le tampon acide ou la suspension mère colorée.

Le pH doit être compris entre 3,60 et 3,70.

Après mélange à parties égales avec du sérum frais de bovin, le pH doit être compris entre 3,75 et 3,85.

Essayer sur des sérums divers et stocker à + 4 °C.

Technique de la réaction et son interprétation.

La réaction d'agglutination est effectuée avec des quantités égales de sérum et d'antigène coloré. Une goutte de sérum est déposée sur la carte; à côté de cette goutte, une goutte d'antigène est déposée à son tour. A l'aide d'une petite baguette, les deux gouttes sont mélangées et étalées.

Le tout est alors agité doucement, par des mouvements de rotation. Le résultat est lu au bout de quatre minutes.

Les résultats sont lus de la façon suivante :

— Agglutination totale : positif.

— Agglutination incomplète : suspect.

— Agglutination nulle : négatif.

Cette méthode est rapide, simple et très sensible. Elle permet de déceler la présence d'anticorps plus précocement et plus durablement qu'avec la S.A.W. et la fixation du complément.

D'après Morgan, la concordance entre les résultats obtenus avec cette méthode et ceux combinés de la S.A.W. et de la fixation du complément (qu'ils soient positifs ou négatifs) est de 97 pour cent.

En résumé, c'est une très bonne méthode qualitative, économique, mais sa spécificité et sa sensibilité

nécessitent l'interdiction des vaccins vivants pour qu'elle acquierre toute son efficacité.

1.2.4. *Muco-agglutination*

Le mucus est dilué au 1/20 dans une solution physiologique formolée à 2 pour mille. On chauffe à 56 °C pendant une heure et l'on centrifuge à 3 000 tours/minute pendant cinq minutes. On effectue l'épreuve avec le liquide surnageant.

1.2.5 *Spermo-agglutination*

On centrifuge le sperme à 3 000 tours/minute pendant cinq minutes et l'on effectue l'épreuve avec le liquide surnageant.

La spermo-agglutination présente un réel intérêt pour les taureaux destinés à la reproduction. Dans certains cas rarissimes, c'est le seul moyen de diagnostic; or les taureaux introduits dans les Centres d'insémination sont des vecteurs possibles très dangereux, surtout depuis que le sperme est congelé à — 70 °C; un taureau pouvant contaminer tout un bac d'azote liquide, soit plusieurs années d'activité.

2. Mise en évidence des sensibilisatrices du sérum

Fixation du complément.

C'est une réaction sérologique destinée à visualiser la formation du complexe antigène-anticorps, non directement observable. Pour cela, on utilise la propriété d'un groupe d'éléments, le complément qui, présent dans le sérum sanguin, provoque l'hémolyse de globules rouges (phénomène visible) lorsqu'ils ont été sensibilisés. Or ce complément présente, conjointement à la propriété ci-

dessus, la propriété de se fixer sur un complexe antigène-anticorps.

En bref, un système antigène-anticorps-complément est visible; c'est le système globules rouges de mouton-sérum hémolytique antimouton-complément de cobaye.

Un autre système antigène-anticorps-complément est invisible; c'est, par exemple, le système brucella-anticorps brucelliques-complément de cobaye.

Si l'on ne met qu'une quantité limitée et suffisante de complément, captée par la deuxième réaction, elle ne lyse pas les globules rouges : c'est positif. Si les globules rouges sont lysés, c'est qu'il n'y a pas correspondance antigène-anticorps.

Dans un premier temps, on provoque la réaction antigène-anticorps en présence de complément dosé. Le complément se fixe seulement si le sérum provient d'un animal malade puisque, dans le cas d'un sérum sain, il n'y a pas d'anticorps, donc pas de complexe où il puisse se fixer.

Dans un deuxième temps, on ajoute au couple formé un couple hémolytique : globules rouges de mouton-sérum antiglobules de mouton décomplémenté.

Si les sensibilisatrices existent dans le sérum suspect, le couple antigène-anticorps fixe le complément et le couple hémolytique reste inactif; il n'y a pas d'hémolyse des hématies; la réaction est positive. Par contre, en l'absence de sensibilisatrices, le complément se fixe sur le couple hémolytique, le rend actif (il y a lyse) : la réaction est négative.

La réalisation pratique de cette technique est assez délicate. En premier lieu, il faut chauffer le sérum de l'animal suspect afin de détruire le complément tout en conservant les anticorps. Les sérums de bovins doivent être chauffés de 56 °C à 60 °C pendant trente à

cinquante minutes. Puis il faut titrer le complément (celui-ci est constitué par le mélange des sérums d'une dizaine de cobayes mâles). Ce titrage est nécessaire car, d'un cobaye à l'autre, le taux peut varier. Le sérum hémolytique est aussi titré, mais ce titrage est effectué par le fabricant. On titre également les antigènes car ils sont plus ou moins anticomplémentaires et ils agissent dans une zone bien précise de dilution. L'antigène, ni en défaut ni en excès, doit être employé à raison de deux unités par tube. Le complément est titré en présence de deux unités d'antigène.

Tous ces préliminaires achevés, on peut exécuter la réaction elle-même. Dans une série de tubes à essai, on verse des doses égales de solution de sérum chauffé, mais à des dilutions croissantes, de l'antigène et du complément titré à deux unités. On place le tout au réfrigérateur pendant une nuit, puis dix minutes à 37 °C. On ajoute alors le couple hémolytique et l'on maintient les tubes à essai à 37 °C pendant une demi-heure environ. Cette technique, dite de KOLMER, est effectuée à froid car la fixation du complément sur la combinaison antigène-anticorps est plus sensible à froid qu'à chaud. Toutefois, la réaction à chaud est parfaitement employable et supprime un certain nombre de phénomènes d'anticomplémentarité.

La spécificité de la réaction de fixation du complément est telle qu'elle élimine pratiquement toutes les fausses réactions, positives ou négatives, si gênantes lors de la séro-agglutination. En outre, elle permet une distinction entre les animaux infectés et les animaux vaccinés, si toutefois ceux-ci l'ont été dans leur jeune âge.

En effet, dans ce cas, le taux des sensibilisatrices diminue rapidement pour devenir nul vers le dixième mois après la vaccination. Malheureusement, la réaction

de fixation du complément est plus délicate à mettre en œuvre que la séro-agglutination. De plus, l'antigène n'est pas standardisé et les résultats obtenus sont variables avec des antigènes différents.

Le gros inconvénient de la fixation du complément est l'existence de sérums anticomplémentaires, sur lesquels aucune conclusion ne peut être formulée au moyen de cette technique. L'existence de ce phénomène d'anticomplémentarité oblige à faire un témoin sérum sur tous les sérums. La fixation du complément oblige donc le laboratoire à exécuter deux examens au lieu d'un seul.

3. Autres méthode sérologiques

La brucellose, comme les autres maladies infectieuses, a donné lieu à une multitude d'examens.

3.1. Immuno-fluorescence

Pour mémoire, on peut dire que la méthode directe est spécifique, mais qu'elle donne des résultats positifs avec *Yersinia enterolytica*. C'est une méthode un peu compliquée, mais un peu plus précise que le Stamp.

La méthode indirecte, quant à elle, peut être employée comme méthode de détection sérologique.

3.2. Diffusion : immuno-diffusion

Les techniques de précipitation en milieu gélifié ne sont pas rentrées dans le domaine du diagnostic courant.

3.3. Électrophorèse

Elle n'est pas sortie du domaine de la recherche, en matière de brucellose, conjointement à l'immuno-électrophorèse.

3.4. La conglutination

Méthode malheureusement non en usage, quoique précise et d'exécution assez commode.

3.5. L'hémagglutination

L'hémagglutination passive et titrée, selon la technique de Dubois, par traitement des globules rouges aux sels de chrome. Cette technique fine et sensible devrait être plus largement répandue.

4) Résumé des principaux diagnostics sérologiques

Les principaux diagnostics sérologiques de la brucellose peuvent se classer selon le schéma suivant :

	Avantages	Inconvénients	Remèdes
S.A.W.	simplicité, fidélité, titrage de l'antigène, réponse en unités.	manque de sensibilité, manque de spécificité (tularémie), prise de sang, possibilité du phénomène de zone.	faire des dilutions, travailler en sérums hypersalés.

	Avantages	Inconvénients	Remèdes
Ring-Test	très grande simplicité, très sensible, économique, pas de dilutions.	applicable aux seules femelles laitières, diagnostic de groupe, vaisselle laitière dure à laver.	tube à usage unique.
Lacto-Séro-Agglutination	évite la prise de sang sur les femelles laitières.	inconvénients cumulés des deux méthodes ci-dessus.	
Fixation du complément	fidélité, sensibilité, spécificité, possibilité de réponse chiffrée.	le témoin sérum qui oblige à deux réactions simultanées, les titrages multiples des réactifs, difficulté de la lecture à 50 pour cent, sérums anti-complémentaires.	réactifs standards, automatisation de la lecture des deux réactions.
Test au Rose de Bengale	simplicité mais doit se faire sur le sérum, spécificité, sensibilité, précocité, pas de dilution, susceptible d'un traitement en flux continu.	pas de réponse chiffrée, doit être complétée par une fixation du complément.	
Coombs	spécificité, sensibilité, précocité, possibilité de réponse chiffrée.	travail en discontinu à cause des centrifugations.	centrifugeuses de grosse capacité.

DU CHOIX DE LA MÉTHODE D'AUTOMATISATION

Le dépistage des animaux malades ou infectés latents, par des analyses de laboratoire et notamment par le séro-diagnostic de Wright et la fixation du complément, permet de lutter efficacement contre cette maladie contagieuse. Les analyses doivent être renouvelées plusieurs fois sur un même sujet. En France, leur nombre, dans le cadre d'une prophylaxie étendue à l'ensemble des cheptels bovin, ovin et caprin, est évalué à au moins 25 millions par an.

Aussi, la Direction des Services vétérinaires du Ministère de l'Agriculture s'est-elle orientée vers une automatisation des opérations du laboratoire pour apporter une solution raisonnable à ce problème.

L'automatisation est indispensable, il est inutile d'en donner les raisons.

1. Les principales méthodes automatiques

Trois méthodes existent présentement :

— le flux continu;

— les microméthodes automatiques;

— la dilution préclassée.

1.1. Le flux continu

Il existe principalement deux sortes d'appareils : « Technicon » et « Coultronics ».

« Technicon » a mis au point la fixation du complément et la séro-agglutination rapide.

La séro-agglutination a été prévue avec un antigène voisin de celui nécessaire pour le Ring-Test.

Peut-être la méthode est-elle applicable au test au Rose de Bengale, étant donné la non-dilution des sérums. La possibilité d'agitation en flux continu durant un temps très fixe, la possibilité de couplage avec un programmateur imprimant le numéro d'ordre des sérums permettent le triage de tous les échantillons au rythme de 1 000 par jour environ, ce qui est excellent.
Il ne faut pas oublier, comme le rappellent les auteurs anglais, que cette méthode est très sensible à l'égard des animaux vaccinés au B 19 dans leur jeune âge. Une expérimentation semblerait souhaitable.

Les autres méthodes de séro-agglutination ne semblent pas encore praticables en flux continu.

Pour la fixation du complément, Vargues et ses collaborateurs ont entièrement étudié le problème. Le système marche, le rendement peut atteindre cinq cents échantillons par jour, mais les dilutions arithmétiques suivies sont très difficiles d'exécution: par contre, l'hémolyse 50 pour cent est bien précisée, le titrage du complément et le titrage de l'antigène sont faciles par dilutions exponentielles.

Le gros inconvénient paraît consister dans la nécessité de repasser tous les sérums non négatifs afin de détecter les anticomplémentaires.

Le prix de l'appareillage avec programmateur incorporé n'est pas négligeable; d'autre part, le deuxième passage de certains sérums est une cause d'erreur.

Le nouvel appareillage « Coultronics » ne nous est pas connu. Ses possibilités paraissent importantes et peut-être le prix en rapport. « Coultronics », pour certains de ses appareils, imprime les résultats, préalablement contrôlés, sur une fiche, évitant tout le travail de secrétariat technique en aval de l'installation.

Le flux continu paraît très séduisant lorsqu'il n'y a pas de dilution à effectuer et que le phénomène étudié est une fonction continue et croissante, quelle que soit la concentration du produit recherché dans l'échantillon liquide. Il n'en est pas de même s'il y a phénomène de zone ou rapport optimum entre un réactif et le produit à doser.

1.2. Les microméthodes automatiques

A côté des dilutions en tubes, il a été mis au point des dilutions en plaque de plexiglas; puis les volumes ont été réduits, les plaques sont devenues d'un tout petit format permettant, avec une précision relative, de manipuler des doses de l'ordre de 25 microlitres. La forme des plaques est étudiée pour permettre la lecture facile de l'hémolyse ou de l'agglutination. Leur extrémité inférieure est un cône de révolution à grand angle ou un ellipsoïde de révolution.

La manipulation de quantités inférieures à 50 microlitres ne permet pas l'usage de pipettes ou d'aiguilles gardant sur leurs parois des quantités non négligeables par rapport à ces volumes. On peut donc distribuer les volumes uniquement par gouttes et diluer avec des oëses ou des fraises retenant par capillarité une certaine quantité de liquide, mais le compte-gouttes ou la fraise ne sont justes volumétriquement que si la tension superficielle est constante. Le système ne peut donc être

fidèle qu'avec des produits dont la tension superficielle ne varie pas avec les dilutions.

La lecture des réactions en plaque n'est pas encore commodément automatisée; il est donc nécessaire avec ce genre de méthode d'effectuer des transcriptions et des appréciations oculaires, qui obligent à compter avec l'erreur humaine.

Sous ces réserves, les avantages restent tout de même considérables car, du fait des petites quantités, le prix de revient est extrêmement bas et il permet d'employer des réactifs précis, purifiés, dont l'usage est interdit en pratique courante.

La petite quantité de sérum mis en œuvre permet également de multiplier les diagnostics avec des prélèvements minimes. Le matériel de prélèvement, étant donc de format réduit, peut être de meilleure qualité. et son acheminement est facile.

Mais la prophylaxie de la brucellose est basée sur des titrages : titrage de l'antigène pour la séro-agglutination, titrage de l'antigène et du complément pour la fixation du complément, réponse pour l'une et l'autre de ces analyses un Unités Internationales, c'est-à-dire exactitude des dilutions pour différents animaux. On ne saurait donc, sans une expérimentation soigneuse. adopter un matériel quelles que soient au départ, pour un esprit scientifique, ses capacités de séduction.

Les microméthodes gardent, cependant, un intérêt primordial dans le triage de différents sérums à l'égard de différentes maladies. Un appareil spécialisé nous est connu : c'est l'appareillage « Cooke », employé dans de très nombreux laboratoires.

	Flux continu	Micro-Méthodes	Dilution préclassée
Rendement horaire.	50	200	200
Encombrement ...	réduit	nul	important
Entretien	important	nul	négligeable
Quantité de réactif.	non négligeable	nulle	importante
Personnel	qualifié	qualifié	non qualifié
Enregistrement des résultats....	manuel ou automatique	manuel	automatique
Prix	cher avec enregistreur	moyen	très réduit
Servitudes	électricité eau	électricité vide	électricité, eau pression

1.3. La dilution préclassée contrôlable

Lorsqu'une sanction économique ou morale doit être prise, il importe de s'entourer de garanties scientifiques ne laissant que peu de place au hasard. Il est donc évident, lorsqu'une décision d'élimination est fonction d'un simple taux de dilution du sérum, que ce taux de dilution soit précisé avec un minimum de rigueur.

Comme il ne nous est pas possble, pour l'instant et dans notre domaine, de mesurer des poids ou des nombres de molécules, il nous faut mesurer des volumes si possible petits et avec des erreurs inférieures à 10 pour cent. C'est pourquoi notre préférence va à un système de dilution volumétrique contrôlé, car la confiance naît du contrôle chiffré et non de l'appréciation subjective.

Ce sont ces conceptions qui ont guidé, jusqu'à présent, les Services du Ministère de l'Agriculture.

On exposera le détail de l'appareillage dans la suite de ce travail.

L'automatisation raisonnable n'a pas pour but de remplacer seulement le travail matériel de la laborantine, mais aussi le travail matériel de la secrétaire. Automatiser les dilutions, la distribution des réactifs n'est qu'une partie du programme; il faut essayer d'automatiser également la lecture des résultats et leur transcription, et dans tous les cas éviter d'écrire sur des tubes ou des étiquettes. Si l'on est obligé d'écrire sur une feuille de diagnostic, on doit posséder un double imprimé permettant le contrôle. Il faut donc, dès l'arrivée d'un échantillon, lui donner (en une seule fois) un numéro ou, mieux, une place fixe qu'il conserve pendant toute sa vie au laboratoire, afin de le retrouver toujours très facilement et d'avoir, lors de doute ou de confusion, une trace matérielle pouvant, à tout instant, donner lieu à une vérification.

Des méthodes fugitives ne peuvent procurer au Chef de laboratoire les certitudes nécessaires; au contraire, le cloisonnement des échantillons dans de petits espaces numérotés, irrenversables, suivi d'une réaction conservée et grossièrement appréciable à l'œil nu, est infiniment préférable.

La bonne méthode doit comporter une trace indélébile permettant la vérification.

En fait, le système ne consiste pas à automatiser la seule réaction, mais aussi à standardiser l'identification du cheptel, le matériel de prise de sang, la fabrication et le titrage des réactifs, l'exécution de la réaction, la lecture, la transcription et la diffusion des résultats et, à tous ces différents stades, de permettre un contrôle commode. La bonne méthode oblige, en outre, l'exécutant à un travail correct et qui engage la responsabilité du maître d'œuvre.

2. Les différents schémas prophylactiques

Il n'est pas du cadre de ce travail de proposer une méthode de lutte contre la brucellose, mais on ne peut pas construire ou exploiter un matériel sans méthode et sans but. L'exposition des différents types de prophylaxie a pour effet le choix de l'appareillage approprié et orienté vers la polyvalence en cas de changement de programme.

On peut concevoir différents systèmes, mais la France est un pays varié, comportant des ovins, des bovins et des caprins, des races laitières, des races à viande et des races mixtes, des élevages traditionnels et modernes, de la transhumance d'été et d'hiver, etc., donc, si l'on peut s'inspirer des méthodes étrangères, il est naïf de croire que l'on pourrait les transposer rapidement sur l'ensemble du territoire français.

Plusieurs schémas prophylactiques peuvent être employés.

2.1. Schéma basé sur le Ring-Test

Il nécessite un plan complémentaire pour les animaux à viande. Il impose, pour être valable, la suppression absolue de toute vaccination à vaccin vivant, en dehors des étables à brucellose réputée contagieuse.

Pour le troupeau laitier, le système est facile :

— sérologie généralisée;

— sérologie sévère sur les animaux introduits;

— un contrôle périodique au Ring-Test.

Pour les étables infectées de brucellose abortive répétée :

— un contrôle sérologique semestriel;

— éviter l'introduction d'animaux neufs.

Pour les étables ne comportant qu'un petit pourcentage d'animaux sérologiquement non négatifs :

— un contrôle sérologique périodique, voire annuel.

Les troupeaux à viande et les ovins doivent être soumis au contrôle sérologique.

Ce type de prophylaxie nécessite l'automatisation du Ring-Test et l'automatisation de la séro-agglutination de Wright, ainsi que de la fixation du complément.

2.2. Schéma basé sur le test au Rose de Bengale

Il nécessite une prise de sang chez tous les animaux et l'exécution de ce test sur une très grande échelle. Or le test au Rose de Bengale semble pouvoir être automatisé. La détection de non-négatifs entraîne la sérologie de toute l'étable, et la prudence veut que cette sérologie soit effectuée avec deux réactions : une réaction d'agglutination et une réaction d'hémolyse.

Le contrôle des étables négatives est facile : les laitières par le Ring-Test, les autres par le test au Rose de Bengale. Le prélèvement de sang étant minime, l'emballage, l'expédition, les manipulations diverses sont facilitées. Par contre, les étables atteintes de brucellose contagieuse et les étables d'infectés latents doivent faire l'objet d'un contrôle sérologique.

Le test au Rose de Bengale, sous réserve d'une bonne standardisation, d'un prix raisonnable et d'une automatisation simple, n'est donc pas dénué d'intérêt.

L'application du test au Rose de Bengale interdit tous les vaccins vivants car, autrement, du fait de la sensibilité du test, des examens sérologiques complémentaires seraient nécessaires sur pratiquement tous les animaux.

2.3. Schéma basé sur la prise de sang et la S.A.W.

Ce schéma, un peu perfectionniste, consiste à négliger le Ring-Test tant que les vaccins vivants sont autorisés et à soumettre l'ensemble du cheptel à une prise de sang sous un volume important (prise de sang semestrielle, annuelle ou biennale), afin de permettre une séro-agglutination en sérum physiologique normal et en sérum hypersalé. La déviation du complément à un tube, voire la déviation du complément en dilution plus poussée, l'exécution d'un test de Coombs sur les sérums anti-complémentaires, les dosages de matières minérales dans le sérum ou le plasma, l'établissement de la formule sanguine au moyen d'un double prélèvement simultané deviennent possibles et établissent des diagnostics ayant une importance économique. Le sérum est, en effet, un extraordinaire témoin immunologique et physiologique qu'il est dommage de mal exploiter. Prélever du sang pour un seul diagnostic, prélever du lait pour faire une seule recherche, relève du gaspillage de l'énergie et de la négation même de l'automatisation que l'on veut appliquer. Prélever une grande quantité de sang et amortir le prix de chaque prélèvement avec un très gros appareillage automatique pratiquant toutes les analyses possibles dans d'énormes laboratoires à personnel réduit, apparaît comme la solution la plus économique.

L'automatisation de la S.A.W. est maintenant réglée; cette automatisation va sous peu devenir probablement polyvalente : S.A.W. - Fixation du camplément. Il est dommage de ne pas étendre cette polyvalence.

Le test au Rose de Bengale est simple et précis; automatisé, il rendrait des services considérables. Mal s'en

servir pour utiliser de mauvais vaccins vivants est anti-économique.

Le Ring-Test a fait ses preuves. Si l'on pouvait en rationaliser l'emploi ou avoir un appareillage aussi bien conçu que celui qui permet le dosage de la matière grasse par turbidimétrie, un personnel non qualifié au niveau des laiteries simplifierait considérablement le contrôle. Le Ring-Test est une des rares analyses où l'on ne dilue pas l'échantillon. Il est dommage de ne pas s'en servir avec la méthode à flux continu.

De toute manière, tous les schémas prophylactiques et tous les modes de dépistage de la brucellose font plus ou moins appel à la séro-agglutination et plus ou moins appel à la fixation du complément. Dans ces conditions, il apparaît logique d'automatiser d'abord ces deux réactions. L'automatisation de la séro-agglutination est chose faite; quant à la fixation du complément, elle comporte encore quelques mises au point : les travaux de Vargues et de ses collaborateurs devant être cités en exemple.

AUTOMATISATION DU SERO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT

1. Conditions préliminaires

Un célèbre manuel de laboratoire expose toutes les questions en trois parties :

— ce qu'il faut;
— ce qu'il faut faire;
— ce qu'il faut dire.

1.1. Ce qu'il faut

1.1.1. *Du sérum*

Il est nécessaire qu'il arrive dans un emballage assez standard, même pour une analyse manuelle, car il faut le centrifuger, et tous les transvasements sont des pertes de temps et des confusions d'échantillonnages. Les expéditions de sang n'étant pas réparties de façon homogène au cours de l'année, il faut faire passer en priorité les achats et les sérologies d'avortement, et parfois conserver les sérums de prophylaxie pendant un certain délai. Le meilleur procédé de conservation est le froid.

Quatre-vingts laboratoires achetant des centrifugeuses et des réfrigérateurs peuvent déjà faire des marchés et obtenir des prix, si le matériel est standardisé.

1.1.2. *De l'antigène*

L'État, étant acheteur exclusif, peut pratiquer des contrats léonins et, dans tous les cas, se garantir de toute rupture d'approvisionnement et de toute surprise par l'établissement d'appels d'offres.

L'antigène est nécessaire en quantité considérable. 100 millilitres d'antigène concentré ne permettent d'effectuer que 400 séro-diagnostics. Pour faire 400 000 S.A.W., il faut déjà 1 000 flacons de 100 millilitres et, pour faire 4 000 000 de S.A.W., 10 fois plus. Or, compte tenu des 20 millions de bovins et des 10 millions d'ovins, on fera 15 millions de S.A.W. par an en France. Comme un S.A.W. coûte 35 centimes la pièce, rien qu'en antigène le prix de ce dernier a une importance considérable. Ne serait-il pas logique de prévoir, pour certains gros laboratoires qui font plus de 1 000 S.A.W. par jour, la livraison de l'antigène en flacons d'un litre, et ne serait-il pas souhaitable de voir ces flacons recevoir un autre usage que le seul usage de contenant, en constituant ultérieurement un flaconnage utilisable et récupérable par les laboratoires départementaux ?

Le simple tonnage d'eau distillée ou plus simplement permutée, à mettre en œuvre, peut aussi donner lieu à une certaine rationalisation.

1.1.3. *Des liquides de dilution*

Par tube, il faut 0,5 millilitre pour diluer le sérum et 0,45 millilitre pour diluer l'antigène. Compte tenu de la dilution dans le premier tube, il faut environ 1 millilitre de diluant par tube, soit 5 millilitres par S.A.W. Un million de S.A.W. nécessite donc 5 000 litres de liquide de dilution. Comme, par litre, il y a 8,5 g de chlorure de sodium et 5 grammes de phénol, 15 millions

de S.A.W. nécessitent 375 kg de phénol et 637,5 kg de chlorure de sodium. De telles quantités peuvent faire l'objet de marchés. Les quantités pourraient être livrées par multiples de 8,5 g et 5 g, soit en flacons, soit en comprimés, soit en sachets plastiques. Une manipulation industrielle éviterait des manipulations au laboratoire.

1.1.4. *Des contenants*

On peut se servir de tubes de verre en plexiglass; on peut laver les tubes, les jeter ou les brûler. On peut se servir d'ampoules en plastique formées et soudées au moment de la réaction. Avec les nouvelles techniques de l'emballage et du conditionnement, de multiples solutions sont possibles; elles ont été envisagées par Vaills.

1.1.5. *Des pipettes*

Le matériel pourrait être rationalisé et les pipettes employées devraient correspondre aux pipettes en service, utilisées sur les machines. Un des intérêts de l'automatisation, c'est la standardisation et, là encore, l'État obtiendrait des marchés en imposant le même matériel à tous les laboratoires.

1.1.6. *La température*

Il n'y a pas de problème d'étuve à l'heure actuelle.

1.1.7. *Le matériel d'écriture*

La standardisation des papiers s'impose. Il est essentiel que les vétérinaires écrivent le numéro de l'animal sur le tube de prélèvement, que les étiquettes soient arrachables et transférables. Il est évident que gagner dix minutes en effectuant une réaction et en perdre autant pour lire et transcrire les résultats, laisse à désirer.

Le nombre des réactions impose la lecture automatique et, si possible, la transcription automatique.

Le seul moyen d'effectuer de bonnes écritures est de tout classer avant : c'est le préclassement; un ordre rigide est introduit dans un système qui le digère manuellement ou, mieux, mécaniquement.

1.2. Ce qu'il faut faire

Il faut mettre les tubes dans des portoirs.

Il faut distribuer du diluant.

Il faut distribuer, dans un seul tube, une certaine quantité de sérum à tester.

Il faut diluer le sérum dans le diluant, en progression géométrique et avec précision.

Il faut ajouter une quantité très exacte d'antigène.

Entre autres, deux solutions :

Première solution :

— 0,2 ml de sérum mis manuellement dans le premier tube.

— 0,8 ml de diluant dans le premier tube.

— 0,5 ml de diluant dans les quatre tubes suivants.

— Transfert et rejet de 0,5 ml.

— Ajout de 0,5 ml d'antigène.

Tubes	1er tube	2e tube	3e tube	4e tube	5e tube
	—	—	—	—	—
Sérum	0,2	0	0	0	0
Diluant	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5
	Transfert et rejet de 0,5 ml				
Volume restant	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution dans ce volume	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
Antigène titré	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume final	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Dilution finale du sérum	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160

Deuxième solution :

Tubes	1er tube	2e tube	3e tube	4e tube	5e tube
	—	—	—	—	—
Sérum	0,2	0	0	0	0
Diluant	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Transfert et rejet de 0,2 ml				
Volume restant	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Dilution dans ce volume	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Diluant	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Volume	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution dans ce volume	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
Antigène	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Dilution finale	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160

L'avantage est de transférer la même quantité de sérum dans le premier tube que lors de la dilution.

On peut avoir plusieurs solutions. La meilleure est celle qui, précise, réclame le moins de réglage et prend le moins de temps.

Bien entendu, il faut faire un témoin antigène : diluant 0,5; antigène 0,5; mais, surtout dans le but de faciliter et de préciser la lecture, il faut faire manuellement une échelle : la plus élémentaire est sur cinq tubes contenant 1 millilitre ou 2 millilitres pour faciliter les mesures.

Tubes	1er tube	2e tube	3e tube	4e tube	5e tube
	—	—	—	—	—
Diluant	1	0,875	0,75	0,625	0,5
Antigène	0	0,125	0,25	0,375	0,5
Agglutination	100 %	75 %	50 %	25 %	%
Notation	++++	+++	++	+	0

On peut faire des échelles à 5 pour cent, 2 pour cent. Il est très difficile de faire exactement une échelle à 1 pour cent.

1.3. Ce qu'il faut dire

Il faut donner des résultats simples et comparables, et il ne faut pas oublier, en donnant les résultats, que l'antigène est variable puisque, avec le temps, il s'enrichit en antigène soluble; que le sérum est variable puisque, en matière de brucellose, des phénomènes de zone sont assez fréquents et que le temps, le chauffage, la putréfaction altèrent le résultat de l'agglutination.

Les conditions de lecture sont variables : si l'on ne fait pas très soigneusement des échelles, si l'on oublie que l'agglutination est un phénomène statistique, si l'on ne lit pas au point 50 pour cent, on risque de donner des résultats erronés.

Il est convenu internationalement de s'exprimer en Unités. Il est illusoire, de façon pratique, en faisant des dilutions géométriques, de préciser ces unités à plus d'un demi-tube. Il faut donc éviter le ridicule du 134,5 unités. 15, 22, 30, 60, 80 ou 90, 120, 240 suffisent amplement pour donner une bonne idée de l'évolution des agglutinines, sans faire dire à ce phénomène de l'agglutination ce qu'il ne peut pas dire. Il faut avoir la sagesse de se limiter à la lecture de l'agglutination 50 pour cent, c'est-à-dire de 25 pour cent d'antigène en suspension, et se souvenir que pour provoquer, sous un volume d'un millilitre, l'agglutination de la moitié d'un demi-millilitre d'antigène standard, il faut 1,5 unité agglutinante. En une phrase, 1,5 unité agglutinante est ce qui provoque l'agglutination 50 pour cent dans un tube de réaction telle qu'elle est précisée dans notre travail.

2. Principe d'analyse

La technique utilisée est très exactement la transposition, sur des appareils automatiques, du travail effectué manuellement dans les laboratoires traditionnels pour l'exécution du séro-diagnostic de Wright.

Le principe retenu est celui du défilement continu de tubes à essais devant un poste de travail.

• Dans le premier appareil (M_1), le poste de travail effectue les dilutions.

• Dans le second appareil (M_2), le poste de travail effectue les lectures au moyen de cellules photo-électriques et interprète les résultats.

Ainsi ont été créées des unités de manipulation et de lecture permettant d'effectuer automatiquement la totalité des opérations et d'obtenir, du même coup, imprimés côte à côte sur une même bande, les résultats chiffrés d'une analyse et les numéros d'identification des sérums expertisés.

Ces unités automatiques d'analyses sérologiques sont le résultat d'une collaboration étroite entre l'Administration et une entreprise privée : la Société Satas *, qui a réalisé et mis au point les prototypes et qui assure maintenant la fabrication en série des machines.

3. L'appareillage utilisé

3.1. Vue d'ensemble du matériel

Une unité sérologique élémentaire se compose de :

3.1.1. *Bandes porte-tubes et paniers de manipulation :* 24 paniers de 12 bandes chacun.

---

* SATAS, 107, rue Henri-Barbusse, 92110 Clichy (France). Tél. 270.85.40.

3.1.2. *Une machine électro-mécanique de type M_1* qui, au moyen d'un jeu de cinq seringues de précision, à commande pneumatique, effectue automatiquement les dilutions des sérums et l'adjonction de l'antigène.

La cadence du travail de cette machine est de deux cents séries d'épreuves par heure, soit, à cinq opérations par sérum, l'équivalent de mille manipulations à l'heure.

3.1.3. *Une machine de type M_2* qui effectue néphélémétriquement la lecture des réactions par un système breveté de doubles cellules photo-électriques opérant en comparaison.

La mesure s'exprime en pourcentage d'antigène ou en pourcentage d'agglutination avec une précision supérieure à 1 pour cent.

La cadence de travail de cette machine est de quatre cents séries d'épreuves par heure. Une imprimante couplée à la machine M_2 inscrit en clair, côte à côte, les résultats, en croix, lus par cette machine et les numéros d'identification des sérums analysés.

3.2. Paniers, bandes porte-tubes

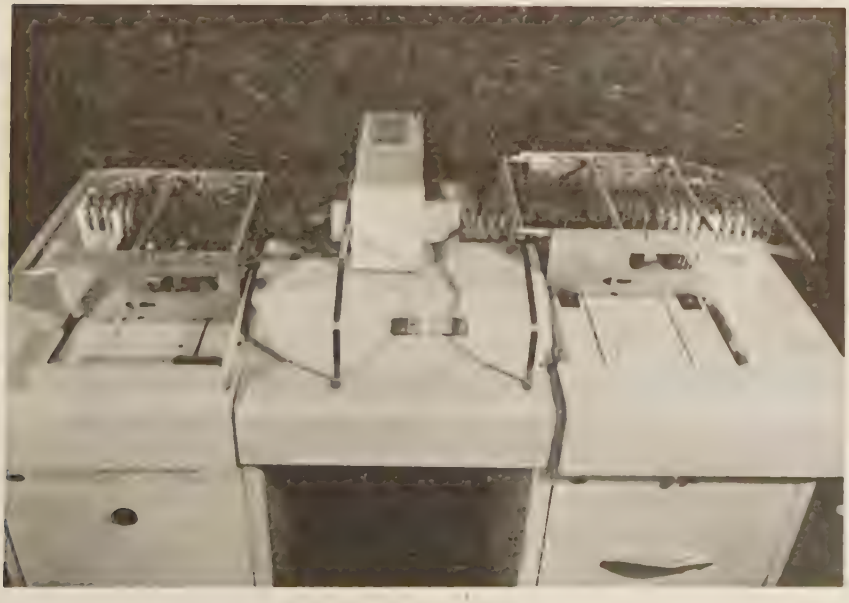
La traditionnelle paillasse de sérologie est remplacée par un ensemble constitué d'un panier qui comprend douze bandes portant chacune quatre séries de cinq tubes de verre pyrex calibrés.

Le laborantin place dans le premier tube de chaque série 0,2 millilitre de sérum à analyser. La machine se charge d'effectuer les dilutions nécessaires, de tube à tube.

Le panier constitue une unité de travail : 48 S.A.W.

MACHINE M1 (DISTRIBUTRICE)

MACHINE M2 (LECTRICE)



3.2.1. *La bande*

C'est une plaque d'acier inoxydable, découpée, perforée et numérotée. Les découpes à la partie supérieure permettent d'insérer de façon rigide les tubes pyrex (quatre séries de cinq tubes).

Cette insertion rigide se fait au moyen de petits anneaux d'acier à ressorts appelés « clips »; leur forme est particulière et brevetée. L'agrafage se fait automatiquement lors de l'insertion des tubes. Le montage est très rapide et, sauf en cas de casse d'un tube, n'a plus à être recommencé.

A sa partie inférieure, la bande porte deux séries de trous :

— quatre trous de 5 mm de diamètre, dont l'espacement est calculé pour correspondre au pas de l'organe qui commandera les mouvements sur la machine;

— dans sa partie inférieure, la bande porte également des trous de 2 mm qui reçoivent des rivets placés de telle façon qu'ils représentent en code le numéro de la bande. Il est possible de coder de 1 à 3 999.

Sécurités.

Le numéro ainsi codé est reproduit en clair entre la première et la deuxième série de tubes afin de permettre à l'opérateur de connaître, s'il le désire, le numéro de la bande qu'il a entre les mains.

Le premier panier comporte donc les bandes dont les numéros sont de 1 à 12, le second de 13 à 24, etc.

Afin d'éviter toute erreur de manipulation, l'extrémité de la bande porte une petite encoche dont le niveau est croissant dans chaque panier, suivant le numéro des bandes, si bien que celles-ci rangées, l'opérateur voit une ligne d'encoches régulièrement montante. Au con-

traire, si une bande est mal classée, l'opérateur peut le déceler immédiatement car la ligne des encoches n'est plus régulière.

La bande a un sens aval et amont. L'aval est repéré par un trou en partie inférieure, l'amont est encoché.

3.2.2. *Le panier*

Il est constitué par une tôle perforée, en acier inoxydable. Le fond du panier comporte trois lignes de plots régulièrement espacés. Ils matérialisent le rail dans lequel glisse chacune des douze bandes. La partie supérieure comporte une entretoise et deux bras basculants qui viennent immobiliser les bandes dans le panier. Deux poignées permettent des manipulations aisées.

La partie inférieure du fond porte deux rangées de trous de 4 mm qui permettent aux bandes transporteuses de faire avancer les paniers. Ces paniers portent des dégagements dont le but est d'assurer le fonctionnement des contacts contrôlant l'avance automatique des paniers au moment opportun.

Sécurités.

Contrairement aux bandes, les paniers ne sont pas numérotés, chaque panier pouvant, au cours des différentes opérations, recevoir un lot de bandes différent.

Une flèche perforée dans la paroi du panier permet à l'opérateur de ne pas tâtonner et de placer immédiatement sur la machine le panier dans la bonne position. Il doit toujours voir les flèches dirigées vers sa gauche, quant il fait face à la machine, car c'est vers la gauche que les bandes circulent. La flèche désigne l'aval.

3.2.3. *Cheminement des bandes sur les machines*

a) *Alimentation. Réception.*

Quelle que soit la machine dont il s'agit, machine M_1 (distributrice) ou machine M_2 (lectrice), le système est le même (toujours identique à lui-même).

Sur une machine en cours d'opération, on commence par placer un panier vide sur la partie réception de la machine, puis on place un panier plein sur la partie alimentation. Il suffit de placer le panier correctement sur les rails et, dès que la machine est mise sous tension, les deux paniers viennent se placer automatiquement :

— le panier d'alimentation, de façon que la première bande se trouve juste en face du chemin de défilement de la machine, et le panier de réception, de façon que le premier emplacement de bande se trouve en face du même chemin.

Au fur et à mesure des opérations de travail, les bandes sortiront du panier d'alimentation, pas à pas, et, traversant le chemin des bandes, rentreront dans le panier de réception.

Le panier d'alimentation avance d'un pas chaque fois qu'une bande l'a quitté complètement; le panier de réception avance d'un pas chaque fois qu'une bande y a pénétré complètement.

b) *Chemin des bandes.*

La partie active de chaque machine M_1, M_2, comporte un chemin de bande dans lequel circule la bande en cours de défilement. Ce chemin de bande comporte deux rails parallèles qui maintiennent la bande pendant son trajet. La longueur du chemin de bande est égale à celle d'une bande. Les deux rails portent un certain nombre de contacts qui servent au contrôle de position

de la bande. Ils permettent, en particulier, sur la machine M_1, d'interdire toute distribution, au cas où une bande ne se trouverait pas placée en bonne position pour recevoir le liquide.

Sur la machine M_2, des contacts supplémentaires permettent au passage de lire le code porté par la bande, ce qui permettra une identification rigoureuse du sérum expertisé.

- Constitution des ensembles d'alimentation et de réception.

Ces deux ensembles sont symétriques, sinon identiques. Ils comportent essentiellement deux bandes transporteuses qui sont des courroies crantées portant des plots à distances régulières. Ces plots viennent s'insérer dans les trous placés à la partie inférieure du panier et permettent son avance dans la direction voulue.

Chaque ensemble comporte un moteur et un système de rotation. Le tout est porté par les caissons latéraux de la machine.

Des contacts sont disposés à la surface. Ils permettent de contrôler l'avance d'un panier, ainsi que le début et la fin de celui-ci. La logique interne de la machine fera mouvoir les paniers au moment opportun.

c) *Commande du cheminement dans le chemin de bandes.*

Le cheminement d'une bande à l'intérieur du chemin de bandes est assuré par une courroie transporteuse du même type que celle qui assure les translations des paniers. C'est une courroie portant à intervalles réguliers des plots qui s'insèrent dans les trous de 4 mm situés à la partie inférieure des bandes.

Quels que soient les incidents qui se produisent, présence ou absence de bande dans le panier, une bande

ne pourra jamais être dégagée que lorsque le premier trou correspondant au début de la première série viendra se prendre dans un plot de la bande. Comme l'écartement des plots est égal à celui d'une série, il s'ensuit que c'est au moment du passage d'un plot que passera le premier tube. Cette coïncidence est utilisée pour définir, en synchronisme parfait avec l'avance de la bande, un dispositif de cames : le premier faisant un tour pendant l'avance d'un pas de la bande, le second faisant un tour pendant l'avance d'une série, c'est-à-dire l'exploration d'une série de cinq tubes. C'est ce jeu de cames complexe qui assure la logique cyclique de la machine, et l'on comprend qu'il suffise que les contacts du chemin de bandes indiquent la présence d'une bande pour que toutes les opérations puissent se dérouler normalement.

3.3. Ensemble commun aux deux machines M_1 - M_2

Nous avons vu que chacune des machines M_1 et M_2 comporte un ensemble d'alimentation, un ensemble de réception et un chemin de bandes. Ces trois organes permettent le défilement des bandes.

Dans les deux machines M_1 et M_2 ces trois ensembles, ainsi que le reste des parties actives, sont portés par un chemin rigide constitué essentiellement par deux fers. Ces deux fers sont fixés sur deux caissons, droit et gauche, dans lesquels sont logées les parties électrique et logique de la machine.

Au total, une machine, qu'elle soit M_1 ou M_2, a un peu l'allure d'un bureau dont la plaque supérieure serait un mécanisme et les tiroirs une logique.

3.4. Machine M_1 distributrice

3.4.1. *Sa fonction*

Cette machine sert à préparer les réactions sérologiques sur les sérums à étudier. Elle effectue, à partir d'une série continue de tubes défilant de manière discontinue sous des seringues automatiques, les différentes opérations prévues dans la technique classique du S.A.W. à cinq tubes.

Poste 1 : mettre 0,8 cm^3 de chlorure de sodium à 0,85 pour cent, phénolé à 0,50 pour cent, dans le premier tube.

Poste 2 : mettre 0,5 cm^3 de chlorure de sodium à 0,85 pour cent, phénolé à 0,50 pour cent, dans les quatre tubes suivants.

Poste 4 : opérer des dilutions par report de 0,5 cm^3 de tube en tube, à partir du premier.

Rincer la seringue après dilution et vider.

Poste 3 : mettre 0,5 cm^3 d'antigène dans les cinq tubes. Il est évident que la mise de 0,2 cm^3 du sérum à analyser dans le premier tube constitue une opération préalable qui sera effectuée manuellement.

C'est une machine de distribution et de dilution.

3.4.2. *Descriptif*

Elle est constituée de deux caissons portant un plateau en trois éléments :

a) *Une partie centrale supportant :*

— Un jeu de cinq seringues de précision à commande pneumatique;

— Un bac à nettoyage pour seringues de dilution;

— Un chemin permettant le défilement des bandes porte-tubes sous les seringues;
— Un clavier de commande, manuel ou pneumatique;
— Deux supports de flacons.

b) *Deux parties latérales.*

Elles comportent chacune un dispositif permettant d'effectuer automatiquement l'animation des paniers sur des rails de guidage.

Le défilement des tubes et celui des paniers se faisant automatiquement, il n'y a pas besoin de liaison mécanique avec les organes de la machine : toutes les liaisons se font à l'aide d'un schéma logique, électrique, contrôlant un matériel pneumatique.

Le dispositif d'avance des tubes possède un arbre à cames complexe qui commande, au moment opportun, les différents vérins pneumatiques qui assurent la distribution et la dilution.

Ces vérins sont contrôlés par des électrovannes groupées sur une plaque située à l'arrière de la machine. Toutes les liaisons sont faites par câbles, en ce qui concerne le circuit électrique, par tubes souples pour le circuit pneumatique. Ce sont des vérins pneumatiques avec amortissement en fin de course.

c) *Vérins et seringues de distribution.*

Les vérins commandent les seringues et forment des complexes vérins - seringues. Ce sont eux qui ajoutent dans les tubes les réactifs. Ils sont au nombre de trois :

— deux à l'entrée de la machine (postes 1 et 2),
— un à la sortie (poste 3).

Le premier vérin - seringue distribue 0,5 cm^3 de diluant dans les tubes 2, 3, 4, 5 de chaque S.A.W.

Le deuxième distribue 0,8 cm^3 de diluant dans le premier tube de chaque série.

Le vérin de sortie distribue 0,5 cm^3 d'antigène dans tous les tubes de la série.

d) *Vérins et seringues de dilution* (poste 4).

Les deux seringues sont montées sur un support. Celui-ci, en synchronisme avec l'avance pas à pas de la bande, se déplace de haut en bas et de bas en haut, permettant à la seringue de dilution de plonger dans le tube arrêté sous elle, de prélever 0,5 millilitre de liquide, de remonter avec ce liquide, de le rejeter dans le tube suivant, de redescendre dans celui-ci, de prélever 0,5 ml de liquide dilué, de remonter, etc., ceci jusqu'au cinquième tube.

A chaque montée et descente du support, la deuxième seringue plonge dans un bac à circulation d'eau et effectue automatiquement son nettoyage. A la fin de chaque série de cinq tubes, le support portant les deux seringues opère automatiquement une rotation, présentant à une nouvelle série de tubes la seringue qui a effectué son nettoyage pendant la dilution de la série précédente. Ainsi, pour chaque série d'épreuves, une seringue bien rincée effectue la dilution.

Le principe réalisé est celui du défilement discontinu des tubes à essais devant un poste de travail constitué de seringues, dont le fonctionnement est programmé en synchronisation avec le défilement des tubes.

La précision de la dilution est à quelques pour cent près, mais il est intéressant de savoir que les opérations effectuées par chaque seringue sont très semblables entre elles. En un mot, les opérations sont répétitibles et l'appareil est fidèle. Il est parfaitement contrôlable puisqu'il est possible, au début de chaque journée de travail et grâce au dispositif de commande manuelle,

Tubes	1er tube	2e tube	3e tube	4e tube	5e tube
Sérum à analyser	0,2 ml mis manuellement	0	0	0	0
Solution de NaCl à 0,85 pour cent, phénolé à 0,50 pour cent, mise automatiquement	0,8 ml par la première seringue	0,5 ml par la deuxième seringue	0,5 ml par la deuxième seringue	0,5 ml par la deuxième seringue	0,5 ml par la deuxième seringue
Tête de dilution	TRANSFERT				Rejet de 0,5 ml
Antigène mis automatiquement par la seringue à antigène	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Dilution finale du sérum	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160

de faire fonctionner une seringue dans le but de remplir une petite éprouvette graduée, ce qui permet en 10 ou 100 coups de vérifier l'exactitude des quantités distribuées. On peut aussi, sur un ou plusieurs coups, avec de l'eau distillée à 4 °C ou un liquide très dense, comme le bromoforme, effectuer des pesées indiquant la précision des quantités distribuées. Le contrôle de la justesse de l'appareil est facile.

La machine nécessite quelques petits réglages; notamment, il faut que les aiguilles en bout de seringue soient coudées pour que les liquides frappent la paroi du tube et non le fond; il faut que l'extrémité de ces aiguilles soit à une distance assez fixe de l'orifice des tubes qui se promènent dans le chemin de défilement. Si l'on ne respecte pas cette dernière condition, on risque de délivrer les volumes en dehors des tubes ou de briser les seringues.

Quant aux vérins, quelles que soient les erreurs de manipulation, ils ne sont jamais endommagés.

Le panier de réception, rempli par douze bandes consécutives contenant 48 S.A.W, — chaque S.A.W. comportant cinq tubes contenant dans l'ordre, sous un volume de 1 millilitre, un sérum dilué du 1/10 au 1/160, — est mis à l'étuve à 37 °C et la réaction est lue le lendemain matin.

3.5. Machine M2 lectrice

3.5.1. *Sa fonction*

Cette machine lit les réactions qui se sont produites pendant l'incubation à l'étuve à 37 °C et envoie vers l'imprimante l'identification des sérums analysés et les résultats chiffrés des réactions obtenues.

3.5.2. *Vue d'ensemble de la M_2*

Comme la machine M_1, la machine M_2 est constituée de deux caissons portant un plateau de trois éléments :

— une partie centrale supportant :
  - un néphélémètre,
  - un chemin de défilement des bandes passant par l'élément optique de lecture,
  - un clavier composé de six touches;
— deux parties latérales, semblables à celles de la machine M_1, permettant l'animation des paniers sur des rails de guidage;
— un tiroir électronique permettant le tarage ou le réglage de la lecture par l'évaluation de l'antigène restant en suspension.

3.5.3. *Le problème de la lecture*

Après la M_1, au cours du passage à l'étuve, dans certains tubes, les germes en suspension dans le mélange sont agglutinés et précipitent, soit en totalité, soit en partie.

La turbidité des tubes est liée à la quantité de germes agglutinés et précipités au fond du tube.

Il tombe sous le sens que si un tube, par exemple, contient 100 milliards de germes et qu'aucune réaction ne se produit, il n'y aura rien au fond du tube et, grossièrement, les 100 milliards resteront en suspension. Si, au contraire, il se produit une réaction totale d'agglutination, il ne restera rien en suspension et les 100 milliards de germes seront localisés dans le culot.

On peut mesurer le degré d'agglutination, soit en pesant le culot, soit en estimant ce qui reste en suspension.

Il est compliqué d'évaluer la quantité de germes dans le culot; par contre, trois méthodes permettent de mesurer les particules en suspension :

1° *L'absorptiométrie.*

Il faut avoir recours à un opacimètre canaliculaire où seuls les rayons rectilignes sont mesurés avant et après passage dans la suspension. Tous les rayons diffractés ou déviés sont éliminés des canaux de réception; seuls, les rayons ne rencontrant pas de particules pénètrent dans la cellule de sortie.

Il existe, entre l'énergie incidente et l'énergie émergente, un rapport que traduit une fonction exponentielle si l'épaisseur traversée est toujours la même.

Intensité émergente = Intensité incidente × e — concentration

$$I_e = I_i . e^{-c}$$

2° *Turbidimétrie.*

C'est la mesure du rapport entre la lumière incidente et la totalité de la lumière sortante, c'est-à-dire la somme de la lumière transmise et de la lumière diffusée.

En général, on mesure la lumière transmise et une partie seulement de la lumière diffusée, dans des conditions bien précises, qui constituent la géométrie de l'appareil.

3° *La néphélémétrie.*

C'est la mesure directe de la lumière diffusée, dans une étendue angulaire plus ou moins grande, autour d'une direction faisant avec celle du faisceau incident un angle de 90°.

On ne mesure que le rapport entre la lumière incidente et la lumière diffusée qui obéit aux lois de Rayleigh :

$$\text{Lumière diffusée} = K \cdot \text{lumière incidente} \cdot \frac{m^2 - m_0^2}{m^2 + 2\,m_0^2} \cdot \frac{N\,V}{\lambda^4}$$

m = indice de réfraction des germes.
m_0 = indice de réfraction du milieu.
N = nombre de germes en suspension.
V = volume des germes.
λ = longueur d'onde.

Le rapport des indices est à peu près fixe, au moins pour les fortes dilutions de sérums, donc :

$$\frac{m^2 - m_0^2}{m^2 + 2\,m_0^2} = \text{approx. constante.}$$

Un bon antigène brucellique comporte des germes récoltés jeunes, donc de forme bien cocobacillaire, c'est-à-dire à peu près sphérique et de volume très semblable.

Si, en plus, on travaille avec une longueur d'onde qui, sant être monochromatique, est assez uniforme et si cette longueur d'onde est grande (cas de la lumière rouge), la diffusion se fait assez uniformément et :

$$\frac{V}{\lambda^4} = \text{constante.}$$

La formule devient une fonction linéaire du nombre de particules.

Lumière diffusée = lumière incidente . (constante) . N

Il existe une proportionnalité directe entre la quantité de particules et la valeur de l'effet néphélémétrique.

C'est cette troisième méthode qui est appliquée dans la M_2.

Les énergies sont transformées en courants et les courants mesurés dans une espèce de pont de Wheastone.

Un tube contenant en suspension la totalité de l'antigène introduit au départ donnera dans la M_2 deux fois plus de courant qu'un tube agglutiné à 50 pour cent.

Il devient donc possible, en réglant correctement les courants émis, de les mesurer et de les classer en cinq groupes correspondant aux notations :

0			
+	=	agglutination	25 pour cent.
++	=	—	50 pour cent.
+++	=	—	75 pour cent.
++++	=	—	100 pour cent.

En convenant que l'antigène utilisé est à 100 pour cent dans chaque tube à la sortie de la M_1, l'antigène est à la concentration 50 pour cent dans un volume de 1 millilitre.

Le tableau ci-dessous permet de comprendre le travail de la M_2 qui traduit des pourcentages d'agglutination en cinq chiffres.

Pourcentage d'agglutination	Pourcentage d'antigène restant en suspension	Nombre de croix	Chiffre donné par l'imprimante
de 100 à 87,25 %	de 0 à 6,25 %	++++	4
de 87,25 à 62,50 %	de 6,25 à 18,75 %	+++	3
de 62,50 à 37,50 %	de 18,75 à 31,25 %	++	2
de 37,50 à 12,50 %	de 31,25 à 43,75 %	+	1
de 12,50 à 0 %	de 43,75 à 50 %	0	0

50 pour cent d'antigène étant le tube témoin rempli de :

— 0,5 ml de diluant,

— 0,5 ml d'antigène titré, considéré connu à 100 pour cent.

Une bonne mesure doit tenir compte des quelques pièges suivants :

1° L'agglutination 100 pour cent n'est jamais au zéro de la machine, même un tube neuf contenant 1 millilitre d'eau pure sans aucune particule en suspension ne donne pas un courant nul.

2° Un sérum totalement négatif provoque, quand même, un léger dépôt de l'antigène, surtout s'il contient des sels biliaires. Même le tube témoin (0,5 ml de sérum phénolé + 0,5 ml d'antigène) n'a pas la même valeur juste à la sortie de la M_1 et le lendemain matin, après une nuit d'étuve à 37 °C.

3° Le dépôt normal, sans anticorps, de l'antigène est variable avec le temps d'étuvage, la température de l'étuve et aussi avec les variations de température.

Le phénomène n'est pas appréciable à l'œil nu, mais la M_2 voit très bien que le même tube témoin ne donne pas le même courant électrique dix minutes après la sortie d'étuve et deux heures après.

Il faut donc respecter un ordre ou une habitude, afin de donner des résultats comparables.

Un antigène dilué à 44 pour cent baisse d'une valeur potentiométrique allant de 554 à 514 (la valeur potentiométrique est directement proportionnelle au nombre de germes) en une nuit, soit 6 pour cent, et ensuite de 514 à 494 en dix heures à température ordinaire, soit 3 pour cent. Ce même antigène à 31 pour cent baisse de 400 à 380 en une nuit et de 380 à 370 en dix heures, à température ordinaire.

Le même antigène dilué à 6 pour cent dans les mêmes conditions ne varie pratiquement pas.

Du fait qu'il existe un grand nombre de paramètres, le seul moyen de se contrôler est de faire une échelle. Plusieurs systèmes sont possibles :

On encadre :

50 %

43,75 % soit { 44 %
42 %

31,25 % soit { 32 %
30 %

18,75 % soit { 20 %
18%

6,25 % soit { 8 %
6 %

0

Avec dix tubes, on peut avoir une bonne idée des lieux où se placent les chiffres 0, 1, 2, 3, 4.

On peut aussi faire une échelle de 2 en 2 pour cent, soit 0, 2, 4, 6..., jusqu'à 50 pour cent.Une telle échelle donne donc :

	50 %	
	48	
Coupure 0/1 ou $^{0}/_{+}$	46	0
	44	
	—	
	42	
	40	
	38	1
	36	
	34	
Coupure 1/2 ou $^{+}/_{++}$	32	
	—	
	30	
	28	
	26	
	24	2
	22	

Coupure 2/3 ou $^{++}/_{+++}$	20	
	—	
	18	
	16	
	14	3
	12	
	10	
Coupure 3/4 ou $^{+++}/_{++++}$	8	
	—	
	6	
	4	4
	2	
	0	
	—	

Il est inutile de faire une échelle à 1 pour cent. On arrive très mal, étant donné l'adhésion des germes sur les parois des pipettes au 1/100 et le calibre des tubes ainsi que leur propreté, à effectuer une telle échelle sans chevauchement. On peut aussi diluer de l'antigène avec un rhéomètre de 10 millilitres à 80 pour cent ou à 85 pour cent. On obtient ainsi un bon encadrement des points recherchés.

De toute façon, il faut faire une échelle pour 576 S.A.W. = 12 paniers. L'échelle doit être passée en tête pour voir si le réglage est bon, et en fin de lecture pour vérifier que les 25 pour cent ± 6 pour cent sont bien lus (c'est-à-dire les 2 ou ++).

On peut donc diviser de 50 pour cent à 0 pour cent d'antigène en cinq parties : deux parties ayant une demi-épaisseur et trois parties une épaisseur d'environ plus ou moins 6 pour cent, soit :

0	50)	6,25 %	d'épaisseur
1	43,75)	12,5 %	—
2	31,25)	12,5 %	—
3	18,75)	12,5 %	—
4	6,25)	6,25 %	—
	0)		

en somme, un bon réglage lit 2 à 25 % ± 6 % d'antigène.

On peut aussi diviser facilement de :

0 à 10 % = ++++	4
10 à 20 % = +++	3
20 à 30 % = ++	2
30 à 40 % = +	1
40 à 50 % = 0	0

Dans ce réglage, on lit ++ à 25 % ± 5 % d'antigène.

Nous avons, en somme, un détecteur à deux croix. Quand nous détectons un tube à deux croix, nous détectons que dans ce tube il y a 1,5 unité agglutinante. pourvu que nous ayons bien un antigène qui agglutine lui-même à deux croix avec le sérum international au 1/650. Mais ce serait trop beau, car il faut tenir compte de l'antigène soluble. L'antigène n'est malheureusement pas stable; même concentré. au bout d'un certain temps, un nombre de particules éclatent, se dispersent dans le milieu; d'autres particules, tout en conservant leur figure, laissent filtrer dans le liquide interparticulaire de l'antigène soluble en quantité non négligeable. Cet antigène soluble sature certains anticorps et abaisse à la longue, de un tube à un tube et demi, la limite de dilution provoquant l'agglutination 50 pour cent. Si l'on voulait donc faire de très bonnes mesures, il faudrait non seulement une échelle, mais encore un

sérum sous-étalon et l'on devrait recalculer le nombre d'unité agglutinantes détectées dans un tube agglutiné à 50 pour cent pour approximativement situer la force agglutinante d'un sérum par millilitre.

On possède donc un néphélémètre automatique, capable de repérer le point d'agglutination 50 pour cent.

Dans les conditions actuelles, le S.A.W. ne constitue donc pas un titrage mais un repérage; le tout est de faire ce repérage correctement, de façon à pouvoir raisonnablement comparer les résultats d'une étable d'une année à l'autre.

3.5.4. *Le néphélémètre utilisé*

Les particules d'antigène en suspension, frappées par un faisceau lumineux, diffusent la lumière, et l'intensité de cette diffusion est directement proportionnelle au nombre de particules en suspension (sous les réserves faites précédemment : cf. § 3.5.3. 3°).

Le néphélémètre utilisé est d'un type particulier, avec deux cellules photo-électriques : une cellule de lecture, une cellule de référence.

a) *Source lumineuse.*

Afin d'exploiter facilement les signaux qu'émettra l'appareil, l'émission de lumière n'est pas continue, mais sinusoïdale. La source lumineuse, lampe à incandescence, est placée derrière un volet tournant qui donne des périodes bien déterminées de lumière et d'obscurité.

b) *Faisceau d'éclairement.*

La lumière émise, comme il est dit plus haut, et condensée par un système de lentilles, se réfléchit sur un semi-miroir à 45°, de façon à créer un faisceau parallèle qui pénètre dans le tube de haut en bas.

c) *Cellule de référence.*

Une partie du faisceau lumineux traverse le miroir dont il est question au paragraphe précédent et va frapper une cellule photo-électrique, dite cellule de référence.

d) *Cellule de lecture.*

La lumière réémise par les particules en suspension est concentrée par un système optique et vient frapper une cellule photo-électrique, dite cellule de mesure.

e) *Technique de la lecture.*

En comparant un instant donné le flux lumineux reçu par la cellule de référence et celui reçu par la cellule de lecture, on obtient directement et en vraie grandeur la quantité d'énergie lumineuse réémise par le tube.

La cellule de référence corrige toutes les variations accidentelles d'éclairement de la lampe et ceci, quelles que soient ces variations, à un instant donné.

Il suffit donc d'opposer les courants émis par les deux cellules pour avoir une expression électrique exacte du nombre de particules en suspension dans le tube.

C'est le principe de mesure qui est utilisé sur la machine M_2.

3.5.5. *Exploitation des résultats de la lecture et impression*

Pour exploiter le résultat de la lecture du néphélémètre, on utilise un dispositif original que l'on assimile à un système de pesée à partir d'une tare représentant le poids de la lumière émise par la cellule de référence. L'appareil ajoute au poids de la lumière émise par la cellule de mesure des poids marqués. Le dispositif se bloque dès que le nombre de poids marqués est satis-

faisant pour représenter l'équilibre des deux plateaux de la balance.

Chaque fois qu'il ajoute un poids marqué, le dispositif électronique émet un « top ». Ces tops sont comptés et sont ensuite transmis à l'imprimante. C'est ce dispositif qui permet à la machine de classer une lecture suivant les tranches définies, c'est-à-dire :

0, +, ++, +++, ++++,

et se traduisent par : 0, 1, 2, 3, 4.

Au passage de la bande, la machine a pris en mémoire le numéro de code constitué par les plots dont il est question au début.

Au fur et à mesure du passage des bandes, elle compte et garde en mémoire les séries. C'est la combinaison de tous ces résultats qui se retranscrit sur la bande de la machine imprimante. Bien entendu, tout ce dispositif n'est pas celui d'une balance de poids marqués, c'est une électronique qui introduit des résistances successives, mais le principe est absolument le même.

L'organe d'impression permet d'inscrire sur le papier les différents résultats et identifications se rapportant à une bande, et qui ont été enregistrés dans la machine.

Exemple de bande :

	Numéro de la bande	Numéro de la série	Numéro du département	Tubes 1 2 3 4 5
	2634	4	82	4 3 0 0 0
	2635	1	82	0 0 0 0 0
	2635	2	82	4 4 4 4 4
ex.	2635	3	82	4 3 2 1 0
	2635	4	82	4 2 0 0 0
	2636	1	82	0 0 0 0 0

Il faut donc lire :

— bande n° 2635

— position de la série sur la bande : 3

— n° de la série : 26353

— département : Tarn-et-Garonne (82).

Les chiffres indiquent le nombre de « + » dans le tableau suivant :

	Tubes	1	2	3	4	5
	Chiffre	4	3	2	1	0
	Dilution finale du sérum	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
	Nombre de croix	++++	+++	++	+	0
	Pourcentage d'agglutination	100	75	50	25	0
(1)	Pourcentage d'antigène	de 0 à 6,25 %	de 6,25 à 18,75 %	de 18,75 à 31,25 %	de 31,25 à 43,75 %	de 43,75 à 50 %
(2)	Unités	> 1,5	> 1,5	1,5	< 1,5	< 1,5

Titre du sérum : 40 × 1,5 = 60 U.I.

(1) Tube témoin avec 0,5 ml de diluant + 0,5 ml d'antigène = 1 tube à 50 pour cent d'antigène.

(2) Avec un antigène titré (agglutination à 50 pour cent en présence du sérum étalon de Weybridge dilué au 1/650, le résultat se lit : 60 Unités Internationales.

L'intérêt de la M_2 n'est donc pas de faire une lecture à quelques pour cent près, mais de se débarrasser de l'appréciation humaine et surtout, par le préclassement des sérums, d'éviter les erreurs matérielles qui, elles, sont impardonnables.

4) Utilisation et avantages de la machine

4.1. Utilisation du groupe M_1 - M_2

4.1.1. *Principe d'utilisation*

Rythme bas.

L'unité de travail en sérologie courante de brucellose est de douze paniers de douze bandes de quatre séro-agglutinations, soit 576 S.A.W. Ces douze paniers sont sur un chariot adéquat et, pour diluer les sérums de ces douze paniers à la M_1, il faut une demi-journée.

La M_1 est donc capable de distribuer

$$2 \times 576 = 1\,152 \text{ S.A.W. par jour.}$$

En fait, avec les échelles, les témoins, les blancs, il faut compter 1 000 S.A.W. par jour et par M_1, avec deux jeux de paniers en service + deux jeux en lavage, soit quatre jeux de douze paniers.

La M_2 a un débit horaire double de la M_1, donc, avec une M_2 employée toute la journée, on peut théoriquement lire 2 000 S.A.W. par jour de travail.

L'expérience montre qu'avec trois personnes, une M_1 et une M_2, faire 500 S.A.W. par jour est facile. Le travail comporte :

— déballage;
— enregistrement, classement et précodage des sérums;
— centrifugation de tous les sérums;
— répartition de 0,2 ml dans tous les premiers tubes de chaque S.A.W.;
— passage à la M_1;
— étuvage à 37 °C;
— passage à la M_2;

— établissement du document restant au laboratoire et remise de trois exemplaires :

- Direction des Services vétérinaires,
- Vétérinaire,
- Éleveur;

— lavage et récupération des venex;

— lavage des paniers.

Comme on ne peut lire que les mardi, mercredi, jeudi, vendredi, soit quatre jours, on peut facilement faire 2 000 S.A.W. par semaine, soit 8 000 par mois, soit 11 × 8 000 S.A.W. = 88 000 S.A.W. par an, c'est le rythme bas.

4.1.2. *Utilisation à 750 S.A.W. par jour*

Rythme haut.

Les trois personnes peuvent, en travaillant à plein, faire un jour 500 S.A.W. et le lendemain 1 000 S.A.W., soit 3 000 S.A.W. par semaine, soit 12 000 S.A.W. par mois, soit 132 000 S.A.W. par an. Dans ce cas, il y a quelqeus difficultés pour laver au jour le jour tous les venex. C'est le rythme haut.

4.1.3. *Utilisation à 1 000 S.A.W. par jour*

Rythme exceptionnel.

Avec quatre ou cinq personnes, on peut, avec une M_1 et une M_2, faire 1 000 S.A.W par jour, soit 4 000 S.A.W. par semaine, soit 16 000 S.A.W. par mois, soit 176 000 S.A.W. par an, si le travail est régulier. Dans ce cas également, il y a quelques difficultés pour laver tous les venex au jour le jour et, de plus, la M_1 travaille à plein, et toute panne ou contretemps bouleverse le rythme.

4.1.4. *Utilisation à 1 500 S.A.W. par jour*

L'utilisation rationnelle du matériel serait d'avoir deux M_1 et une M_2. Pour ne pas trop surcharger les machines, il faudrait les employer aux trois quarts du temps, soit, pour chaque M_1, un jour à 500 S.A.W. et le lendemain à 1 000 S.A.W., comme il est décrit au paragraphe 4.1.2. On ferait ainsi 1 500 S.A.W. par jour et l'on pourrait, l'après-midi, nettoyer une M_1 sur deux. La M_2 serait employée aux trois quarts de ses possibilités, ce qui éviterait de faire chauffer la cellule de lecture. Dans ce cas, il faut six jeux de douze paniers.

Le rendement régulier serait de :

— 6 000 par semaine,
— 24 000 par mois,
— 264 000 par an, soit 24 000 $\times$ 11.

4.1.5. *Utilisation à 3 000 S.A.W. par jour*

Si l'on veut, sans surcharger les machines ni le personnel, avoir toute sécurité, il faudrait disposer de quatre M_1 et de deux M_2 travaillant à 75 pour cent de leurs possibilités, c'est-à-dire le double du système décrit au paragraphe 4.1.4.

On pourrait faire :

— 3 000 S.A.W. par jour,
— 12 000 S.A.W. par semaine,
— 48 000 S.A.W. par mois,
— 528 000 S.A.W. par an.

Dans les périodes de presse, on pourrait atteindre temporairement un maximum de :

— 4 000 S.A.W. par jour,
— 16 000 S.A.W. par semaine,
— 64 000 S.A.W. par mois.

C'est cette dernière solution qui constitue l'unité rentable de sérologie automatique. Au maximum, avec quatre M_1 et deux M_2, on peut faire 4 000 S.A.W. par jour, mais il faut huit jeux de douze paniers un jour, et huit jeux de douze paniers le lendemain, soit seize jeux de douze paniers, si l'on veut faire un ou deux mois à 64 000 S.A.W.

Il existe des solutions intermédiaires entre celles du paragraphe 4.1.4. et du paragraphe 4.1.5. On peut avoir des unités plus importantes que celles prévues au paragraphe 4.1.5.

On peut donc, avec les M_1 et les M_2, organiser des laboratoires de :

130 000 S.A.W.	avec pointe mensuelle de	16 000 S.A.W.
250 000 S.A.W.	—	32 000 S.A.W.
375 000 S.A.W.	—	48 000 S.A.W.
500 000 S.A.W.	—	64 000 S.A.W.

si le travail est régulier.

4.2. Les avantages du procédé

Cette automatisation du séro-diagnostic de Wright permet d'obtenir rapidement des analyses précises et sûres.

Précises, car les dilutions des sérums analysés et les doses d'antigène ajoutées dans les tubes à essai par les seringues pneumatiques sont toujours rigoureusement mesurées.

Sûres, car la lecture des résultats par cellules photo-électriques permet une précision bien supérieure à la lecture humaine et, en outre, l'inscription automatique des résultats et du numéro de référence de chaque sérum en regard l'un de l'autre évite toute erreur de report ou de transcription.

Type de laboratoire	M_1	Pourcentage d'utilisation des M_1	M_2	Pourcentage d'utilisation des M_2	Jeux de 12 paniers	Personnel	S.A.W. par jour	S.A.W. par semaine	S.A.W. par mois	S.A.W. par an	Remarques
I (rythme bas)	1	50	1	25	2	3	500	2 000	8 000	90 000 $\simeq$ 100 000	Facile
I (haut)	1	75	1	37	3	3	750	3 000	12 000	132 000 $\simeq$ 130 000	Dur pour le personnel
I (exceptionnel)	1	100	1	50	4	4 à 5	1 000	4 000	16 000		En limite sur M_1
II (haut)	2	75	1	75	6	?	1 500	6 000	24 000	264 000 $\simeq$ 250 000	Bon rendement
II (exceptionnel)	2	100	1	100	8	?	2 000	8 000	32 000		En limite sur M_1 et M_2
III (haut)	3	75	2	56	9	?	2 250	9 000	36 000	396 000 $\simeq$ 350 000	M_2 mal utilisée
III (exceptionnel)	3	100	2	75	12	?	3 000	12 000	48 000		En limite sur M_1
IV (haut)	4	75	2	75	12	?	3 000	12 000	48 000	528 000 $\simeq$ 500 000	Bon rendement
IV (exceptionnel)	4	100	2	100	16	?	4 000	16 000	64 000		En limite sur M_1 et M_2

Environ quatre-vingts unités automatiques sont en service dans les laboratoires départementaux de la Direction des Services vétérinaires du Ministère de l'Agriculture.

Cet équipement est complété par des portoirs appareillés aux paniers de manipulation et par des chariots de laboratoire qui permettent de transporter directement les paniers à manipuler dans des étuves à circulation d'air spécialement construites.

La mise en œuvre de telles unités permet de libérer le chef de laboratoire de la tâche très lourde, fatigante et sujette à erreur, que représente la lecture des réactions et de réduire le personnel de moitié pour ce qui concerne les manipulations.

En outre, il ne nécessite pas de personnel hautement qualifié, ce qui permet de disposer de centres d'analyses efficaces, même dans les régions où les spécialistes font momentanément défaut. Ce peut être le cas des vastes régions d'élevage à densité de population humaine faible, ou des pays en voie de développement.

Tous les pays possesseurs de troupeaux importants peuvent être intéressés par cette création française qui permet un contrôle systématique du cheptel et, par conséquent, l'élimination des animaux contaminés.

CONCLUSION

Il faut être favorable à la mécanisation du diagnostic pour les raisons suivantes :

Dans le domaine de l'action sanitaire, quelques points sont essentiels : d'abord, et au centre du problème, se situe le diagnostic de la maladie. En amont, doit être réglé d'une manière très précise la circulation, le transport, le commerce et l'introduction des animaux. En aval, un contrôle en abattoir (et non en tueries particulières), soit sur l'animal vivant, soit au lieu d'élection des lésions visibles, doit permettre de vérifier l'efficacité des mesures prises ci-dessus.

Dans la lutte contre les maladies transmissibles, il existe dans l'ordre trois stades :

1) L'introduction : le diagnostic peut être grossièrement clinique; il doit presque toujours faire appel au laboratoire car il ne faut pas diagnostiquer seulement les maladies, mais encore les porteurs apparemment sains.

2) Au milieu: l'effectif peut être contrôlé de trois manières :

— Des mesures économiques, car l'étude du rendement prouve l'atteinte du cheptel. La bronchite infectieuse des poules en est un merveilleux exemple;

— Des mesures techniques : le lait, les excréments et tout particulièrement le sang sont des témoins indélébiles et incorruptibles de l'histoire pathologique ancienne et moderne du troupeau.

3) A l'abattoir, à l'équarrissage, l'essentiel est la lésion, la pensée et le diagnostic sont anatomo-pathologiques, toutefois aidés par le laboratoire, y compris dans le domaine du diagnostic histologique.

Dans cette vue globale de la lutte contre les maladies générales, il y a deux religions opposées : celle de l'homme et celle de la machine.

L'homme, c'est le clinicien, c'est l'inspecteur des viandes, c'est le vieil aruspice qui prévoit l'avenir en touchant les lésions. Cet appel à l'homme, c'est un appel au bon sens, aux facultés émérites, c'est la nécessité d'un permanent éveil de l'intelligence, c'est l'existence d'un corps social de vétérinaires dont tous les maillons sont sans faille. Les réussites françaises dans le domaine de la peste bovine, de la péripneumonie, de la morve, de la rage, de la tuberculose et de la fièvre aphteuse prouvent que ceux qui n'ont pas foi en l'homme ont tort.

Mais les brucelloses, les leucoses, certaines maladies parasitaires, certaines mammites ont mis jusqu'à présent, quelle qu'en soit l'excellence, le corps vétérinaire français en défaut. Il est donc nécessaire, dans ces conditions et pour ces buts, de faire appel à la machine qui n'est, tout compte fait, dans les mains du chef de laboratoire, ce qu'est le stéthoscope ou l'oscillographe entre les mains d'un clinicien averti. Il ne faut donc pas opposer les méthodes, mais les faire se suivre comme dans un musée imaginaire où l'on verrait se succéder le dolmen de la table des marchands, le Parthénon et la Sainte-Chapelle : ces trois monuments étant d'indé-

lébiles témoignages des réalisations successives de l'intelligence et des techniques. Il faut donc, hors de toute polémique, soutenir une vieille tradition qui remonte à la fondation des Écoles vétérinaires et, là où l'œil du clinicien est en défaut, adjoindre celui de l'anatomo-pathologiste et, si nécessaire, celui de l'homme de laboratoire et, puisque le geste de ce dernier peut être multiplié par la machine, se résoudre à l'employer largement, avec esprit critique.

Cette thèse n'a eu pour but que d'essayer de montrer que la diversité des conceptions concourt vers le même point fixe qu'est l'amélioration du sort de l'homme par l'action sur les animaux qui lui sont les plus proches : les animaux domestiques.

L'automatisation n'est qu'un des moyens de rendre l'intelligence productive pour le mieux-être de l'homme.

Notre époque, revendicatrice de bonheur, ne peut donc que favoriser tout l'ensemble de la prophylaxie de la brucellose telle qu'elle est mise en œuvre par l'ensemble des vétérinaires français.

Vu :
Le Professeur de l'Ecole vétérinaire
rapporteur,
BERTHELON.

Vu :
Le Directeur de l'Ecole vétérinaire,
R. FLORIO.

Vu :
Le Président de la thèse,
ARMENGAUD.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 3 novembre 1972.
Le Président de l'Université Paul-Sabatier,
L. LARENG.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERNARD L. — Législation sanitaire de la brucellose en France. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 1967.
2. BERTHELON M. — Les brucelloses animales. — Imp. Salingres, Villefranche-de-Rouergue, 1947.
3. — Bases de la prophylaxie de la brucellose bovine. — *Rev. Méd. vét.*, avril 1965, 4, 241-260.
4. BRINLEY MORGAN W. J. — The Rose Bengale plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. — *Vet. Rec.*, décembre 1969.
5. — Section E. Diseases of dairy cattle brucellosis. — *J. Dairy Res.*, 1970, 37, 303.
6. BROCHARD J. C. — De l'emploi du phénol sur les échantillons hémolysés dans le diagnostic sérologique de la brucellose bovine (S.A.W.). — Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 1967, n° 30.
7. BRUCELLOSE. (Normalisation du diagnostic des brucelloses.) — Rapport du Comité d'experts F.A.O. - O.M.S. de la brucellose, 1964.
8. — *Informations techniques des Directions des Services vétérinaires*, janvier 1967, n° 18.
9. — (Les unités automatiques d'analyses sérologiques.) — *Informations techniques vétérinaires*, mai 1969, n° 27.
10. — (La lutte contre la brucellose.) — *Informations techniques des Directions des Services vétérinaires*, avril 1972, n°s 37 et 38.
11. CHARY J. F. — Contribution à l'étude de la brucellose du chien. Une enquête sérologique. — Thèse de doctorat vétérinaire, Alfort, 1970.
12. CORTEZ A. — Brucellose : assainissement sanitaire et assainissement économique. — *Inf. techn. vét.*, mai 1969, n° 27.
13. DENNIS S. M. — Diagnosis of infections abortion in cattle. — *Vet. Med.*, mai 1969, vol. 64, 5.
14. IMMUNOLOGIE. — Notions théoriques et pratiques. — « Documentation scientifique », Lab. Roland-Marie S. A., 15, 17, 19, rue Michelet, 93100 Montreuil.
15. INSTITUT PASTEUR. — Cours d'immunologie générale et de sérologie, 1952.

16. JOUBERT J. — Réaction de fixation du complément. — *Bull. Acad. Vét.*, octobre 1967, 8.

17. JOUBERT J., ROUMIANTZEFF M., VALETTE L. — L'automation en sérologie spécifique. Application au dépistage de la brucellose. — *Rev. Méd. vét.*, avril 1967, 307-320.

18. LAFENÊTRE H. — Intérêt actuel de la brucellose et difficultés de sa prophylaxie. — *Rev. Méd. vét.*, octobre 1965, 676-686.

19. LEFÈVRE. — Le diagnostic de la brucellose par la recherche de l'état allergique. — Thèse de doctorat vétérinaire, Alfort, 1970.

20. LOISELEUR J. — Techniques de laboratoire. — *La néphélémétrie*, t. I, fasc. 1.

21. MARCHIONINI G. — Contribution à l'étude de la sérologie systématisée. La réaction de fixation du complément dans la brucellose et la fièvre aphteuse sur auto-analyseur « Technicon ». — Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 1970, n° 44.

22. MATHIEU E. — Les modalités de la lutte antibrucellique dans l'espèce bovine. — *Inf. techn. vét.*, mai 1969, n° 27.

23. OLIVIER H. R. — Traité de biologie appliquée, t. I. — Librairie Maloine S.A., Paris.

24. PICHE G. — Les agglutinines non spécifiques et post-vaccinales dans la prophylaxie de la brucellose. — Thèse de doctorat vétérinaire, Alfort, 1968, n° 71.

25. PILET Ch., TOMA B. — Techniques de la séro-agglutination dans le diagnostic de la brucellose. — *Cahiers Méd. vét.*, janvier-février 1962, vol, 38, 1, 3-22.

26. PILET Ch., TOMA B., ANDRÉ G. — Le « card-test ». — *Cahiers Méd. vét.*, janvier-février 1972, vol. XLI, 1.

27. RENOUX G., GAUMONT R. — Méthodes de diagnostic biologique des brucelloses animales. — *Ann. Nut. et Alim.*, 1966, vol. 20, 1.

28. RICHARD. — Les immunoglobulines brucelliques. — Thèse doctorat vétérinaire, Alfort, 1970.

29. STUDIEVIC S. C. — Automatisation des réactions de fixation du complément. — Thèse de doctorat en Pharmacie, 1965, n° 419.

30. VARGUES R., VALETTE L., RIVE M., STUDIEVIC C. — Automatisation du dépistage de la brucellose bovine par séro-agglutination ou par fixation du complément avec l'auto-analyseur « Technicon ». — International Symposium on Brucellosis, Tunis, 1968. Symp. Séries Immunobiol. Standard, vol. 12, 383-388. (Karger, Bâle/New York, 1970.)

Imp. Toulousaine (Vve LION), 16, rue Lakanal. — TOULOUSE.

Dépôt légal 4e trim. 72, Aa 650